รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพิสูจน์การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน gp116 ของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง

Identification of Disulfide Bond Formation in the gp116 Isolated from Shrimp Yellow Head Virus

โดย

อภิชัย บัวชูก้าน

พฤษภาคม 2559

สัญญาเลขที่ MRG5380186

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพิสูจน์การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน gp116 ของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง
Identification of Disulfide Bond Formation in the gp116 Isolated from Shrimp Yellow Head Virus

ผู้วิจัย

อภิชัย บัวชูก้าน

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. และ สกอ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง “การพิสูจน์การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน gp116 ของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง” นี้ ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณมา ณ ที่นี้

ขอขอบคุณหน่วยงานต้นสังกัด คือคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี รวมไปถึงศูนย์เครื่องมือกลางคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำหรับการสนับสนุนด้านสถานที่ อุปกรณ์ และครุภัณฑ์วิจัย

ขอขอบคุณชาวประมง และผู้ค้ากุ้งกุลาดำผู้ไม่ประสงค์จะออกนามทุกท่านสำหรับการเอื้อเฟื้อจับกุ้งกุลาดำ และจำหน่ายให้โครงการวิจัยนี้ในราคาย่อมเยา ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ชาติชาย กฤตนัย ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมโปรตีนและโปรตีโอมิกส์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม สำหรับหัวเชื้อไวรัสก่อโรคหัวเหลือง และความกรุณาเป็นที่ปรึกษาการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์แผนกวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี สำหรับการสนับสนุนเบิกจ่ายอุปกรณ์วิจัยนอกเวลาแก่ผู้วิจัย

ผู้วิจัย

พฤษภาคม 2559

รหัสโครงการ : MRG5380186

ชื่อโครงการวิจัย : การพิสูจน์การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน gp116 ของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง

ชื่อนักวิจัย : อภิชัย บัวชูก้าน

หน่วยงานต้นสังกัด : แผนกวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

E-mail : apichai.b@psu.ac.th

บทคัดย่อ

โปรตีน gp116 เป็นหนึ่งในโปรตีนโครงสร้างที่เปลือกหุ้มของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง มีกรดอะมิโน cysteine ที่มีศักยภาพต่อการก่อพันธะไดซัลไฟด์ได้ 26 ตำแหน่ง การวิจัยนี้เน้นศึกษาเพื่อพิสูจน์และระบุตำแหน่งการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ภายในโปรตีนโครงสร้าง gp116 จากอนุภาคไวรัส YHV โดยการย่อยโปรตีนในเจลอะคลิลาไมด์ด้วยเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน และเอนไซม์ทั้งสองผสมกัน วิเคราะห์การก่อพันธะไดซัลไฟด์ด้วย MALDI-TOF/TOF, nanoLC-MS/MS ร่วมกับซอร์ฟแวร์ Mascot, MS-Bridge, MassMatrix, MS2DB^{++} และ Peptidemap ตามลำดับ พบการก่อพันธะไดซัลไฟด์จำนวน 3 พันธะ คือ Cys315-Cys352, Cys589-Cys561 และ Cys849-Cys852 ตามลำดับ ตำแหน่งการก่อพันธะไดซัลไฟด์นี้อาจใช้เป็นข้อมูลสำหรับอธิบายการจัดเรียงโมเลกุลโปรตีน gp116 ร่วมกับ gp64 ที่เปลือกหุ้มอนุภาคไวรัสได้ และอาจสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการออกแบบอุปกรณ์นำส่งระดับนาโนแบบที่มีโครงสร้างคล้ายอนุภาคไวรัสก่อโรคหัวเหลืองได้

Keywords : disulfide bond, gp116, mass spectrometry, yellow head virus

Project Code : MRG5380186

Project Title : Identification of Disulfide Bond Formation in the gp116 Isolated from Shrimp Yellow Head Virus

Author : Apichai Bourchookarn

Address : Section of Agricultural Technology.
Faculty of Science and Technology,
Prince of Songkla University, Pattani Campus

E-mail : apichai.b@psu.ac.th

Abstract

Protein gp116 is one of major structural protein of the yellow head virus (YHV) envelope. This protein has 26 cysteine residues that can potentially form disulfide bonds. This study aimed to indentify and localize intramolecular disulfide bonds of gp116 isolated for YHV. *In gel* digestions were performed using trypsin, chymotrypsin and mixed between both. Digested peptides were extracted and analyzed with MALDI-TOF/TOF and nanoLC-MS/MS in combination with data searching using Mascot, MS-Bridge, MassMatrix, MS2DB^{++} and Peptidemap, rexpectively. The analysis results revealed 3 disulfide bonds which are Cys315-Cys352, Cys589-Cys561 and Cys849-Cys852, respectively. The position of disulfide bonds indentified in this study can be used for insight in molecular folding and arrangement of gp116 and gp64 in the envelope of YHV. It may also employ as a basis for the development of YHV-based nanodelivery-scarfold.

Keywords : disulfide bond, gp116, mass spectrometry, yellow head virus

สารบัญ

กิตติกรรมประกาศ i
บทคัดย่อ ii
Abstract iii
สารบัญ iv
สารบัญตาราง v
สารบัญภาพ vi
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ที่มาและความสำคัญ 1
1.2 สมมติฐานการวิจัย 2
1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 เอกสารวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1. ความสำคัญของพันธะไดซัลไฟด์ต่อโปรตีนบางชนิด 4
2.2 บทบาทของพันธะไดซัลไฟด์ต่อโปรตีนโครงสร้างของไวรัสบางชนิด 4
2.3 การปรับเปลี่ยนการก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนของไวรัสบางชนิด 5
2.4 โปรตีน gp116 ของไวรัส YHV 6
2.5 วิธีการพิสูจน์หาการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนจากไวรัสและโปรตีนอื่นบางชนิด 7
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย 8
3.1 วัสดุที่เกี่ยวข้องและวิธีการวิจัย 8
3.2 วิธีการวิจัย 9
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการวิจารณ์ผล 13
4.1 การเพิ่มจำนวนไวรัสในกุ้งกุลาดำทดลองและการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์ 13
4.2 ผลของ reducing agent ต่อโปรตีนโครงสร้างของ YHV 16
4.3 การแยกโปรตีน gp116 บริสุทธิ์ 17
4.4 การวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกเอนไซม์สำหรับย่อยโปรตีน gp116 จาก YHV 17
4.5 การก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน gp116 18
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย 24
เอกสารอ้างอิง 25

สารบัญตาราง

ตาราง **หน้า**

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการพิสูจน์หาพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนจากไวรัส และโปรตีนอื่นบางชนิด 6
ตารางที่ 2 Observed m/z เปปไทด์ และตำแหน่งที่มีลำดับกรดอะมิโนตรงกับโปรตีน gp116 ของ YHV 16
ตารางที่ 3 Calculated m/z และเปปไทด์จาก gp116 ที่ย่อยด้วย trypsin 19
ตารางที่ 4 Calculated m/z และเปปไทด์จาก gp116 ที่ย่อยด้วย Chymotrypsin 20
ตารางที่ 5 Calculated m/z และเปปไทด์จาก gp116 ที่ย่อยด้วย Trypsin/Chymotrypsin..... 21
ตารางที่ 6 การก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลโปรตีน gp116 22

สารบัญภาพ

รูป **หน้า**

รูปที่ 1 อนุภาคไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง 1
รูปที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน gp116 ของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง 3
รูปที่ 3 การฉีดหัวเชื้อไวรัสก่อโรคหัวเหลืองเข้าบริเวณกล้ามเนื้อส่วนหลังของกุ้งกุลาดำ 9
รูปที่ 4 การวิเคราะห์โปรตีนองค์ประกอบของอนุภาคไวรัส YHV ที่แยกได้ 14
รูปที่ 5 การวิเคราะห์โปรตีนขนาด 116 kDa ด้วย MALDI-TOF 15
รูปที่ 6 การเคลื่อนที่ของ gp116 บน SDS-PAGE (12.5%) ในสภาวะที่บ่มและไม่บ่มกับ reducing agent 17
รูปที่ 7 SDS-PAGE (12.5%) ของโปรตีนจาก YHV ที่ชะออกจาก DEAE-sepharose column ด้วยสารละลาย NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ 18
รูปที่ 8 แผนผังการก่อพันธะไดซัลไฟล์ในโมเลกุลโปรตีน gp116 ของเชื้อไวรัสก่อโรคหัวเหลือง 23

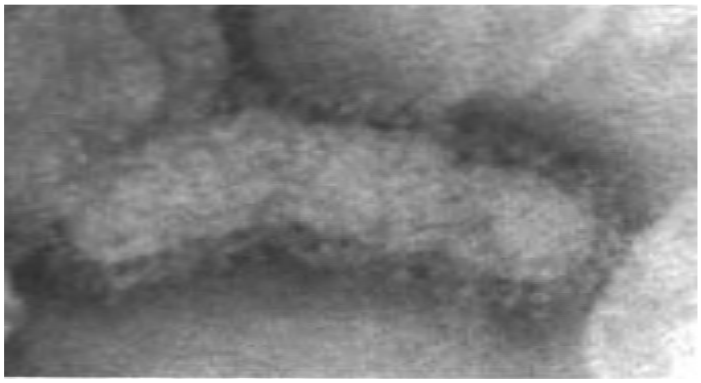
บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

พันธะไดซัลไฟด์จัดเป็นพันธะเคมีประเภทพันธะโคเวเลนซ์ที่เชื่อมต่อระหว่างหมู่ –R ของกรดอะมิโน cysteine 2 หมู่ อาจเกิดภายในสายโซ่โมเลกุล (intramolecular disulfide bond) หรือระหว่างสายโซ่โมเลกุล (intermolecular disulfide bond) ของโปรตีน การเกิดพันธะไดซัลไฟด์มีความสำคัญต่อสมบัติทางกายภาพเชิงโครงสร้างของโปรตีน คือ ช่วยเสริมสร้างความแข็งแรงและความเสถียรของโมเลกุลโปรตีนต่อสิ่งแวดล้อม ในโปรตีนบางชนิดการเกิดพันธะไดซัลไฟด์มีความเกี่ยวข้องกับหน้าที่ตามธรรมชาติของโปรตีนนั้นๆ

การเกิดและคลายพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนโครงสร้างของไวรัสอาจมีความเกี่ยวข้องกับการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของอนุภาคไวรัส เช่น Ryser และคณะ (1) ได้รายงานว่าก่อนที่ไวรัส HIV-I จะเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้จะต้องผ่านกระบวนการสำคัญอย่างน้อยสองกระบวนการคือ การเกาะจับกับโปรตีนตัวตอบรับ (receptor) และการคลายพันธะไดซัลไฟด์ระหว่าง cysteine ในบางตำแหน่งของโปรตีน gp120 ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าการคลายพันธะไดซัลไฟล์นั้นเกิดขึ้นเพื่อลดความกระด้าง (rigidity) ของโมเลกุลโปรตีนลง และเกิดการปรับเปลี่ยนรูปร่างโครงสร้างโปรตีนให้เอื้อต่อการเกาะจับกับโปรตีนตัวตอบรับได้อย่างแน่นหนายิ่งขึ้น

ไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง (shrimp yellow head virus; YHV) จัดเป็นเชื้อไวรัสประเภทอาร์เอนเอสายเดี่ยว ชนิดสายบวก (positive-sense, single-stranded RNA) มีเปลือกหุ้มชั้นนอก (envelope) มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-50 นาโนเมตร ยาวประมาณ 150-200 นาโนเมตร ดังรูปที่ 1.(2, 3) หลังการศึกษาในระดับYHV ถูกจัดกลุ่มอยู่ใน family Roniviridae, genus Okavirus, order Nidovirales (4, 5)



รูปที่ 1 อนุภาคไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง

อนุภาคของไวรัส YHV ประกอบขึ้นจากโปรตีนโครงสร้าง (structural protein) หลัก 3 ชนิด คือ gp116, gp64 และ p20 ตามลำดับ (6-8) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลปรากฏประมาณ 116, 64 และ 20 กิโลดาลตัน (kDa) ตามลำดับ โปรตีน gp116 และ gp64 เป็นไกลโคโปรตีนทำหน้าที่เป็นโปรตีนเปลือกหุ้มชั้นนอกของอนุภาคไวรัส

ส่วน p20 ทำหน้าที่เป็นโปรตีนห่อหุ้มสาย RNA หรือเรียกว่า nucleocapsid protein สำหรับโปรตีน gp116 และ gp64 นั้นเป็นผลิตผลจากพอลิโปรตีน (polyprotein) ที่แปลรหัสมาจากสาย ORF (Opened Reading Frame) เดียวกัน คือ ORF3 และถูกแยกจากกันเป็นคนละสายโปรตีนด้วยกระบวนการตัดด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ภายหลังการแปลรหัสโปรตีน (post-translational proteolytic cleavage) (6)

อย่างที่กล่าวในเบื้องต้นจากรายงานของ Jitrapakdee และคณะ (6) ว่าโปรตีน gp116 ของ YHV นั้นเป็นหนึ่งในสามโมเลกุลของโมเลกุลโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคไวรัส มีลำดับกรดอะมิโนในสายโซ่โปรตีนจำนวน 899 หน่วย (รูปที่ 2) แปลรหัสจากสารพันธุกรรมในลักษณะเป็นสายโซ่โมเลกุลเดียวกับโปรตีน gp64 และแยกออกจากกันโดยการตัดย่อยด้วยโปรตีเอสภายหลัง จากผลการศึกษาต่อๆ มาทำให้ทราบว่าโปรตีน gp116 นี้ มีความเกี่ยวข้องกับการเกาะจับกับตัวตอบรับจำเพาะ (receptor) บนผิวเซลล์และมีบทบาทสำคัญในการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของอนุภาคไวรัส (9-11) จากการวิเคราะห์โครงสร้างปฐมภูมิพบว่าโมเลกุลโปรตีน gp116 ของไวรัส YHV มีกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีศักยภาพสามารถก่อพันธะไดซัลไฟด์ได้อยู่ทั้งหมด 26 ตำแหน่ง ซึ่งมีความเป็นไปได้ของการก่อพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกันได้มากถึง 13 พันธะ แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการม้วนพับเป็นโครงสร้างสามมิติและระยะความเหมาะสมของการก่อพันธะด้วย การทราบถึงจำนวนและตำแหน่งการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนซึ่งยังไม่มีรูปโครงสร้างสามมิติอย่าง gp116 นี้ จะเป็นความรู้พื้นฐานสำหรับศึกษาบทบาทของพันธะไดซัลไฟด์แต่ละตำแหน่งว่ามีความสำคัญต่อโปรตีนอย่างไร และอาจทำนายได้ว่าตำแหน่งใดที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของ YHV นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อทำนายการม้วนพับของลำดับกรดอะมิโนในโปรตีนชนิดนี้ได้

1.2 สมมติฐานการวิจัย

โปรตีนจากสิ่งมีชีวิตทั่วไปหรือแม้แต่โปรตีนของไวรัสจำเป็นต้องมีการม้วนพับให้ได้โครงรูปสามมิติในระดับตติยภูมิที่จำเพาะเพื่อการมีกิจกรรมทางชีวเคมีหรือชีวฟิสิกส์ที่ถูกต้องสมบูรณ์ โปรตีนองค์ประกอบของไวรัสจำนวนหนึ่งจะมีกรดอะมิโน Cysteine เป็นองค์ประกอบในลำดับสายโซ่กรดอะมิโน และกรดอะมิโน Cysteine นี้มักจะก่อพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกัน ทำให้โมเลกุลโปรตีนมีความแข็งแรงทั้งเชิงโครงสร้าง และการทานทนต่อสภาวะแวดล้อม มีสิ่งอื่นซึ่งสอดคล้องกัน เช่น ในการหาโมเดลโครงร่างสามมิติของโปรตีนพบว่า โปรตีนที่มีการเกิดพันธะไดซัลไฟด์มักจะใช้เวลาในการจำลอง (simulate) หาโมเดลโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ที่เหมาะสมน้อยกว่าแบบสุ่ม (12) หากมองกลับมาที่อนุภาคไวรัสดังเช่น YHV ที่สามารถผลิตอนุภาคไวรัสได้ภายในเวลาสั้นๆ หรือการก่อโรคอย่างเฉียบพลันนั้น นอกจากการแปลรหัสยีนเพื่อสังเคราะห์เป็นโปรตีนได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพแล้ว การม้วนพับให้ได้โครงร่างที่ถูกต้องอย่างรวดเร็วก็เป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งช่วยเสริมกัน การเกิดพันธะไดซัลไฟด์จึงน่าจะมีส่วนช่วยลดเวลาที่ใช้ในการม้วนพับให้สั้นลง การทำความเข้าใจการเกิดพันธะไดซัลไฟด์นอกจากแสดงให้เห็นถึงระดับความมีเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีนและใช้ประกอบการทำนายโครงร่างสามมิติของโปรตีนแล้ว ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลเพื่อประกอบการอธิบายบทบาทของโปรตีนในการก่อเป็นอนุภาคไวรัสในมิติเฉพาะเพื่อปกป้องสารพันธุกรรมจากสิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งอาจใช้เป็นรูปแบบตัวอย่างสำหรับการสังเคราะห์วัตถุนำส่งยาหรือเคมีอื่นๆ เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านเพื่อวัตถประสงค์ทางชีวการแพทย์หรือสรีรวิทยาได้ด้วย

TILSGIPEKD KSVLMAPHVL FEAGQPTEPP DCIHWAANGD CFCNSTNCDW
SEHVQTLCPQ TCNTSSPTTT SSATQSLPSS TPSSDADNPC VAQDDAGCYS
YLNDYDESKR TQAIKYTYTL STKNTPHMNA ILTTEQFEEM SLDEARYSDI
VSLYRINNIT SVPGCMYNPV SYYLHGDSVP VTCPSTPRSF GTTYNHQISS
QILYNHKMVN VTVDQRCKTH SDNCWAYYNK ASKSIFIQFH PSYAQKYHNR
ILEPTTLIIP FYPPRDTKTL ATHLGPRVFR NAGDYQIFLE PGWLGRTYLD
GYSYHEIYAS TRHDCRYNMM SGDNKYGINL GDDVLHETIP TPRGYTPSVV
VCGTTFTYYK LHDAVKLPWE SVQYTDIEDI PAGFRDPYDF SVDTPSGPVT
ISVLEEYHDG DSIRETAPKR FFIYYRIMTA RLTPSQVEHL NLSTHATSSW
AAENYISNCY VVRQQFVRNT HPFSFALSYI DYNVTAGSVV RCNEFNIQMD
LLLATFGTAT RTWAAEYRHL PHFLTKRGFY PLEPVTGSAI DYLIVEYNAH
ASRYSHQATY HQFGHPVAKA QTRPGVCPTP RSIRYQGLCY EVDWSVRSPT
PPISGYPDIG TYTSGYIFRD YDYYRFKPKF GNGLYLGKVS AAASIGTYSK
CGKAQSISPY HDHGINTDLG TPVYDSACDS AAYTIPVVKY NGPYSLGVPD
VSCEIHDETL TCGTNSTFRF SICSHKIPYD GPHSVTCINS KDNKVHVVKQ
PGYSYYIAGD PGALHISHNK HKPYTSILKD QINLFHFSYL YQAVAMLFGS
LGYFIFGLYV TLFILTTLWA NIKYIFYAKT TYLGYTVPQR FMAGKTTGCK
MCGLDTKHLK IHARHHKIYI HSPMLGRTFF LWSPIYAILL LSIISPASA

รูปที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน gp116 ของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง
(คัด จาก gi|168251059|gb|ACA21301.1| และ Jitrapakdee และคณะ (6)) ซึ่งมีกรดอะมิโน Cysteine (C) จำนวน 26 ตำแหน่ง

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1.3.1 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อพิสูจน์หาจำนวนพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนโครงสร้างชนิด gp116 จากอนุภาคไวรัสก่อโรคหัวเหลือง
2. เพื่อพิสูจน์หาตำแหน่งของกรดอะมิโน cysteine ที่ก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน gp116 จากอนุภาคไวรัสก่อโรคหัวเหลือง

1.3.2 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยเน้นศึกษาเพื่อพิสูจน์และระบุตำแหน่งการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ภายในโปรตีนโครงสร้าง gp116 จากอนุภาคไวรัส YHV บริสุทธิ์ โดยวิธีการย่อยจำเพาะด้วยเอนไซม์โปรตีเอสร่วมกับเทคนิคการวิเคราะห์ความแตกต่างของมวลเปปไทด์โดย mass spectrometry

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษานี้จะแสดงให้เห็นว่ามีรูปแบบการก่อพันธะไดซัลไฟด์โดยกรดอะมิโน Cysteine ต่างๆ ในโปรตีน gp116 หรือไม่ ถ้ามีจะได้ทราบจำนวนและตำแหน่งของพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน gp116 จากไวรัส YHV ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลประกอบเบื้องต้นในการทำนายการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนต่างๆ ในภาคสามมิติของโปรตีนนี้ และอาจรวมไปถึงการจัดเรียงตัวในเยื่อเปลือกไวรัสเป็นอนุภาคที่มีระเบียบ ซึ่งอาจใช้เป็นโมเดลตัวอย่างระดับโมเลกุลเพื่อการลำเลียง หรือนำส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมายต่อไปได้

บทที่ 2
เอกสารวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1. ความสำคัญของพันธะไดซัลไฟด์ต่อโปรตีนบางชนิด

Itakura และคณะ (13) ศึกษาการปรับเปลี่ยนพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนตัวตอบรับของ Atrial Natriuretic Peptide type C พบว่า พันธะไดซัลไฟด์อันเกิดระหว่าง C104-C132 และ C209-C267 ทำให้เกิดโครงสร้างเป็นรูปห่วงปิด (closed-loop) ความยาว 29 และ 49 อะมิโน ตามลำดับ และพบว่าการสูญเสียพันธะไดซัลไฟด์ทำให้เกิดผลกระทบต่อการจับจำเพาะของ Atrial Natriuretic Peptide อันเป็นประการหนึ่งที่แสดงให้เห็นตัวอย่างการสูญเสียหน้าที่ตามธรรมชาติของโปรตีนเมื่อขาดการคงอยู่ของพันธะไดซัลไฟด์ Liebeton และคณะ (14) รายงานว่า เอนไซม์ไลเปสขนาด 29 kDa ผลิต *Pseudomonas aeruginosa* มีกรดอะมิโน cysteine ในโมเลกุลจำนวนสองตำแหน่ง และทั้งสองก่อพันธะไดซัลไฟด์กัน การเปลี่ยนจาก cysteine เป็น serine ที่ตำแหน่งใดๆ ในสองตำแหน่งนี้ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ และยังแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ไลเปสกลายพันธุ์ที่ผลิตได้ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้เท่าโปรตีนแม่แบบ (wildtype) นอกจากนี้การไม่มีพันธะไดซัลไฟด์ยังทำให้โปรตีนไม่ทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการมีพันธะไดซัลไฟด์ต่อเสถียรภาพของโปรตีนและกิจกรรมตามธรรมชาติของโปรตีน

พันธะไดซัลไฟด์นั้นจัดเป็นพันธะประเภทโคเวเลนซ์จึงมีความเกี่ยวข้องกับความคงตัวของโปรตีนในแง่พลังงาน ซึ่ง Bonander และคณะ (15) ได้ศึกษาพบว่าการสูญเสียพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งก่อพันธะกันด้วย cysteine ตำแหน่งที่ 3 และ 26 มีผลทำให้โปรตีน Azurin สูญเสียเสถียรภาพของโครงสร้างโปรตีนในสารละลาย guanidine hydrochloride โดยคิดเป็นพลังงาน (stabilizing energy) มากถึง 20 kJ/mol

2.2 บทบาทของพันธะไดซัลไฟด์ต่อโปรตีนโครงสร้างของไวรัสบางชนิด

Braakman และคณะ (16) ได้ทดลองเติมสารละลาย DTT ซึ่งเป็นหนึ่งในสารเคมีประเภทที่มีความสามารถขัดขวางและทำลายการก่อพันธะไดซัลไฟด์ของโปรตีนได้ ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเซลล์ซึ่งใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านของไวรัสไข้หวัดใหญ่ (influenza virus) พบว่านอกจาก DTT จะขัดขวางการก่อพันธะไดซัลล์ไฟของโปรตีน hemagglutinin (HA0) ที่เพิ่งสังเคราะห์ใหม่แล้ว ยังมีผลทำให้เกิดการสูญเสียพันธะชนิดนี้ในโปรตีน HA0 ที่มีพันธะเรียบร้อยแล้วด้วย ซึ่งยังผลให้เกิดการสะสม และ ขัดขวางการส่งผ่านโปรตีน HA0 ออกจากเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER) แต่ภายหลังจากการกำจัด DTT ออกไปแล้วพบว่า กระบวนการม้วนพับและส่งผ่านของโปรตีนยังสามารถดำเนินต่อไปได้อย่างปกติ Opstelten และคณะ (17) ศึกษาพบว่ามีการก่อพันธะภายในโมเลกุลของโปรตีนรูปร่างคล้ายหนาม (spike) หรือ โปรตีน S ของ mouse hepatitis coronavirus และกระบวนการนี้เกิดในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (ER) ของเซลล์เจ้าบ้าน การเติมสารลาย DTT ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์มีผลกระทบต่อการม้วนพับเป็นโครงร่างสามมิติของโปรตีน S ภายใน ER และจากการเสียสภาพโครงร่างสามมิตินี้ส่งผลให้โปรตีน S ไม่สามารถรวมตัวกับ โปรตีน M ของไวรัสได้

Cuadras และคณะ (18) ได้ทดลองแยกวาเรียนท์ (variant) grp8 ของ simian rotavirus สายพันธุ์ RRV และพบลักษณะพิเศษของวาเรียนท์ grp8 อันแตกต่างจากสายพันธุ์ต้นแบบ (wildtype) ว่า สาย grp8 ไม่จำเป็นต้องใช้ sialic acid เป็นตัวจับจำเพาะเพื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน และพบว่าไวรัสพันธุ์กลายนี้เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ที่โปรตีน VP4 ซึ่งเป็นโปรตีนตัวกลางที่ทำหน้าที่จับกับโปรตีนตัวตอบรับ (receptor) บนผิวเซลล์เจ้าบ้าน โดยมีการเกิดการกลายพันธุ์ของกรดอะมิโนมากถึง 3 ตำแหน่ง และตำแหน่งหนึ่งที่ได้ทำการศึกษา คือ กรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 267 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโนจาก Tyrosine เป็น Cysteine การกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งนี้ส่งผลกระทบต่อพันธะไดซัลไฟล์ที่เคยมีอยู่เดิมระหว่าง C-318 และ C-380 ในโมเลกุลโปรตีน VP5* โดย C-267 ที่เกิดขึ้นนี้สามารถแย่งก่อพันธะกับ C-318 ในหลอดทดลองได้ ซึ่งเป็นไปได้ว่า การก่อพันธะไดซัลไฟด์ต่างไปจากเดิมนี้ส่งผลต่อการจับจำเพาะเพื่อเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านโดยผลจากความแตกต่างเชิงโครงสร้างโปรตีนที่เกิดขึ้น

Wallis และคณะ (19) ได้วิเคราะห์พบว่าโปรตีน NS1 ของไวรัสกลุ่ม flaviviruses มีกรดอะมิโน cysteine จำนวน 12 หน่วย อยู่ในตำหแน่งซึ่งวิเคราะห์ได้ว่าเป็นบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และได้ศึกษาการก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน NS1 ของไวรัส Dengue-2 และพบว่ามีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโน cysteines จริง ซึ่งเป็นการช่วยเปิดทางการสร้างโมเดลโครงสร้างสามมิติของโปรตีน NS1 จากไวรัส Dengue-2 ได้อีกส่วนหนึ่ง

2.3 การปรับเปลี่ยนการก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนของไวรัสบางชนิด

ในปี ค.ศ. 2001 Fenouillet และคณะ (20) เป็นคณะหนึ่งที่ได้ศึกษาการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของไวรัสเอดส์ (HIV) และพบว่าบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน (เซลล์เม็ดเลือดขาว) มีโปรตีน protein disulfide isomerase (PDI) ซึ่งมีกิจกรรมต่อโมเลกุลโปรตีนของอนุภาคไวรัส HIV ในลักษณะที่ก่อให้เกิดการคลายพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนเปลือกหุ้มอนุภาค (envelope protein, Env) ของ HIV อันส่งผลให้มีการปรับเปลี่ยนโครงร่างสามมิติของโปรตีนและส่งเสริมให้ HIV เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ โดยได้แสดงให้เห็นว่า ทั้งแอนติบอดี และ inhibitor จำเพาะต่อ PDI มีผลทำให้เซลล์เจ้าบ้านติดเชื้อลดลง หรือกล่าวได้ว่าการหยุดการทำงานของ PDI สามารถขัดขวาง HIV ไม่ให้เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านได้ ถัดมา Barbouche และคณะ (21) แสดงให้เห็นว่า โปรตีน HIV-Env หรืออีกชื่อคือ gp120 มีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลเป็นจำนวนมากถึง 9 พันธะ และโปรตีนชนิดนี้เองที่เป็นตัวกลางสำคัญของไวรัส HIV ที่ทำหน้าที่เกาะจับ (bind) กับโปรตีนตัวตอบรับบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน จากการใช้สารเคมีซึ่งไวต่อหมู่ –SH พบเหตุการณ์สำคัญ 3 ประการ คือ (1.) จำนวน หมู่ -SH ที่วัดได้จาก gp120 ที่เพิ่งส่งออกจากเซลล์เจ้าบ้านหรือที่กำลังเกาะจับอยู่กับโปรตีน CD4 (เป็นโปรตีนตัวตอบรับของ HIV บนผิวเซลล์เม็ดเลือดขาว) มีปริมาณน้อยกว่า gp120 ภายหลังมีอัตรกริยา (interaction) กับ CD4 ถึงประมาณสี่เท่า (2.) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของหมู่ –SH เมื่อใช้ PDI-inhibitor และ (3.) มีหมู่ –SH สองหมู่ที่อาจมีการแลกเปลี่ยนชั่วคราวกับโปรตีนตัวตอบรับ มีการทดลองที่คล้ายคลึงกันนี้ใน Newcastle disease virus (NDV) โดย Jain และคณะ (22) ได้ศึกษาการเข้าสู่เซลล์ของ NDV ซึ่งใช้โปรตีนชื่อ Fusion protein หรือ F protein เป็นตัวกลางสำคัญตัวหนึ่ง โดย Inhibitor ต่อ PDI มีผลกระทบต่อการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของ NDV เปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองที่ไม่ใช้ inhibitor จึงได้สรุปว่ากิจกรรมของ PDI และการเปลี่ยนโครงร่างภายหลังเกิดปฏิกิริยาการคลายพันธะไดซัลล์ไฟด์ของ F protein มีความจำเป็นต่อการเข้าสู่เซลล์ของ NDV โดยเสนอว่า F protein น่าจะเปลี่ยนรูปร่างเป็นลักษณะตัวกลางกัมมันต์ที่เอื้อต่อการ

ผสานเยื่อเมมเบรนระหว่างอนุภาคไวรัสและเซลล์เจ้าบ้าน จากตัวอย่างที่ยกมาเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของพันธะไดซัลไฟด์ต่อการเกาะจับกับโปรตีนตัวตอบรับบนผิวเซลล์เจ้าบ้าน และการคลายพันธะไดซัลไฟด์ขณะจะเกาะจับกับโปรตีนตัวตอนรับของโปรตีนจากไวรัส

2.4 โปรตีน gp116 ของไวรัส YHV

ไวรัสก่อโรคหัวเหลือง (YHV) ในกุ้งมีโปรตีนประกอบเป็นโปรตีนโครงสร้างอย่างน้อยสามชนิด คือ gp116, gp64 และ p20 (6, 8) โดยที่ gp116 และ gp64 มีตำแหน่งอยู่ที่เปลือกเยื่อหุ้มไวรัส (viral envelope) ส่วน p20 เป็นโปรตีนที่เกาะกับสาย RNA ของไวรัส ซึ่งรู้จักทั่วไปในชื่อ โปรตีน nucleocapsid โปรตีน gp116 และ gp64 เป็นผลผลิตจากชิ้น ORF เดียวกัน คือ ORF3 ทั้งนี้ Jirapakdee ได้กล่าวไว้ในรายงานตีพิมพ์ว่า มีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ภายในโมเลกุล (intramolecular disulfide bonding) ของ gp116 และ gp64 แต่ไม่ได้มีการแสดงผลการทดลองให้เห็นอย่างชัดเจน

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการพิสูจน์หาพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนจากไวรัส และโปรตีนอื่นบางชนิด

ชื่อโปรตีน	วิธีการ				การเกิดพันธะไดซัลไฟด์	เอกสารอ้างอิง
	การโคลน	การตัดย่อย	การแยก	การวิเคราะห์		
Glycoprotein B (gB), Herpes Simplex Virus Type 2	yes	Trypsin	RP-HPLC	MALDI-TOF, N-terminal sequencing	C89-C548, C106-C504, C180-C244, C337-C385, C571-C608	(23)
G protein from Viral Hemorrhagic Septicemia Virus (VHSV)	no	endoproteinase Lys-C, trypsin	RP-HPLC	MALDI-TOF	C29-C339, C44-C295, C90-C132, C172-C177, C195-C265, C231-C236	(24)
GM2 activator protein	no	Trypsin, *S. aureus* V8, Endoproteinase Asp-N	RP-HPLC	MALDI-PSD	C99-C106, C125-C136, Cl12-C138	(25)
Bovine CD36	no	CNBr, trypsin	RP-HPLC	N-terminal sequencing, MALDI-TOF	C242-C310, C271-C332, C312-C321	(26)
7-kDa plant lipid transfer protein	no	Trypsin, chymotrypsin	RP-HPLC	LC-MS/MS	C10-C24, C25-C60, C2-C34, C36-C67	(27)
Glycoprotein B (gB) human cytomegalovirus (CMV)	yes	CNBr	RP-HPLC	MALDI-TOF, LC-MS/MS	C94-C550, C111-C506, C246-C250, C344-C391, C573-C610	(28)
somatomedin B domain of human vitronectin	yes	CNBr, Pepsin	RP-HPLC	MALDI-TOF, N-terminal sequencing	C5-C9, C19-C21, C25-C31, C32-C39.	(29)
Somatomedin B Domain of Human Vitronectin (r-VN1-51; active form)	yes	partial acid hydrolysis	-	LC-MS/MS, NMR	C5-C9, C19-C21, C25-C31, C32-C39	(30)
non-structural glycoprotein (SGP) of Ebola virus	No	Trypsin	-	MALDI-TOF	Intrachain disulfide bond; C108–C135, C121–C147, Intrachain disulfide bond; C53–C53', C306–C306'	(31)
barley hemoglobin	yes	Trypsin	-	LC-MS/MS	Interchain disulfide; C79-C79'	(32)
laminin β1 chain	yes	Trypsin, endoproteinase AspN, pepsin	RP-HPLC	MALDI-TOF/TOF	C13-C18, C39-C48, C59-C62, C153-C173	(33)
triosephosphate isomerase	yes	Trypsin	-	LC-MS/MS	C81-C83	(34)
Mouse hepatitis coronavirus spike protein	-	-	-	Crystallization	C21–C158, C165–C246,C153–C187	(35)
sodium channel beta1-subunit	yes	-	-	2-D-diagonal-SDS-PAGE	C121-?	(36)
Periaxin	yes	-	-	Mutagenesis	C88-Cys (intermolecular)	(37)

2.5 วิธีการพิสูจน์หาการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนจากไวรัสและโปรตีนอื่นบางชนิด

มีการใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาและเคมี ทั้งการโคลนนิ่ง การตัดย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส reverse phase HPLC และ mass spectrometry หรือ N-terminal amino acid sequencing ประกอบกัน เพื่อพิสูจน์หาตำแน่งและจำนวนพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนหลายชนิดรวมทั้งในโปรตีนที่แยกได้จากไวรัสบางตัว ดังแสดงเป็นตัวอย่างในตารางที่ 1 ซึ่งโดยวิธีการเหล่านี้เป็นการช่วยเบิกทางการวิเคราะห์บทบาทของการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ต่อโครงสร้างและสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนเป้าหมายได้เป็นอย่างดี

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัสดุที่เกี่ยวข้องและวิธีการวิจัย

3.1.1 กุ้งกุลาดำ

ซื้อกุ้งกุลาดำเป็น (ขนาดประมาณ 50-80 กรัม/ตัว) จากพ่อค้ากุ้งทะเล นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ โดยการปรับเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมอัดอากาศ ที่ระดับความเค็ม 25-30 ppt เป็นเวลาหนึ่งวันก่อนการฉีดหัวเชื้อไวรัสโดยให้อาหารเม็ด และมีการพรางแสง เพื่อป้องการการตื่นของกุ้ง

3.1.2 หัวเชื้อไวรัสก่อโรคหัวเหลือง (YHV)

หัวเชื้อไวรัส YHV ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ชาติชาย กฤตนัย ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมโปรตีนและโปรตีโอมิกส์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม ในแบบหัวเชื้อไวรัสที่เตรียมได้ตามวิธีของ Wongteerasapaya และคณะ (2)

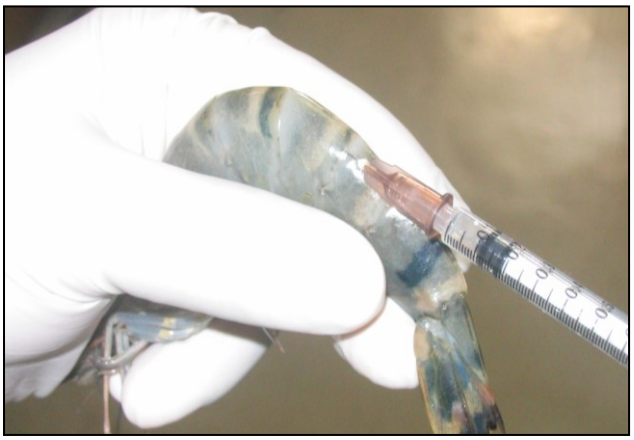
3.1.3 สารเคมีที่เกี่ยวข้อง

Acetonitrile (HPLC grade)	Lab-Scan
Acrylamide	USB
Bis-Acrylamide	USB
Ammonium bi-Carbonate	Sigma
Ammonium acetate	Sigma
Dithiotheital (DTT)	USB
Iodoacetamide	USB
Formic acid (extra pure, cat. 100263)	Merck
Modified-Trypsin Sequencing Grade (cat. V511A)	Promega
Chymotrypsin Endoproteinase, MS Grade (cat.90056)	Thermo Scientific
Ortho-Phosphoric acid	BDH
Sodium Dodesyl Sulphate (SDS)	USB
Trifluroacetic acid	GE Healthcare
TrisBase	USB
Urea	GE Healthcare

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเพิ่มปริมาณไวรัส

การเพิ่มปริมาณไวรัสเพื่อสกัดโปรตีนให้เพียงพอตลอดการวิจัยดำเนินการตามวิธีการของ Bouchookarn และคณะ (38) โดยการดัดแปลงเพิ่ม รายละเอียดดังนี้ เจือจางหัวเชื้อไวรัส YHV บริสุทธิ์ในน้ำกลั่นเย็น 1:10,000 แล้วฉีดไวรัสเจือจางปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักกุ้ง 20 กรัม ด้วยเข็มฉีดยา (26G, Nipro) เข้าบริเวณกล้ามเนื้อส่วนหลังของกุ้งกุลาดำขนาดใหญ่ (~50-80 g/ตัว) (รูปที่ 3) จำนวนอย่างน้อย 50 ตัว ต่อรอบการทดลอง แล้วจึงเลี้ยงกุ้งที่ฉีดเชื้อไวรัสอีกเป็นเวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง ในน้ำทะเลเทียม (ค่าความเค็ม 25 ppt) ให้อากาศโดยเครื่องอัดอากาศแบบใช้ไฟฟ้า ให้อาหารเม็ดปกติโดยสังเกตตามพฤติกรรมการกินอาหารของกุ้ง



รูปที่ 3 การฉีดหัวเชื้อไวรัสก่อโรคหัวเหลืองเข้าบริเวณกล้ามเนื้อส่วนหลังของกุ้งกุลาดำ

3.2.2 การเก็บน้ำเลือดกุ้งกุลาดำและการทำบริสุทธิ์ YHV

หลังจากฉีดเชื้อ YHV เป็นเวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมงแล้ว จึงดูดเลือดกุ้งจากบริเวณแอ่งเลือด (hemoseal) ด้วยเข็มฉีดยาผสมกับสารต้านการแข็งตัวของเลือด (AC) ที่แช่เย็นในน้ำแข็ง ในอัตราส่วน น้ำเลือดต่อ AC เป็น 1:1 แช่น้ำเลือดที่เก็บได้ในน้ำแข็ง หลังจากนั้นจึงปั่นเหวี่ยงน้ำเลือดที่เก็บได้ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบต่ำที่ 960 x g อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงกำจัดตะกอนที่เป็นเม็ดเลือดของกุ้งกุลาดำและเศษเซลล์อื่นๆ ทิ้งไป เก็บส่วนสารน้ำสีฟ้าใสรวมในภาชนะบรรจุใบใหม่ กรองสารน้ำที่ได้ผ่านเยื่อกรอง 0.45 ไมครอน แล้วจึงนำสารน้ำที่กรองได้ไปปั่นเหวี่ยงต่อโดยใช้ความเร็วรอบสูงที่ 18,626 x g (Hettich 1242 rotor) - 20,800 x g .(Eppendorf FA45-30-11 rotor) อุณหภูมิ 4 ˚C เป็นเวลา 30 นาที กำจัดของเหลว เก็บส่วนที่เป็นตะกอนใส แล้วล้างตะกอนใสที่ได้ด้วย AC ปริมาตร 1 ml จำนวน 3 รอบ สลับด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g อุณหภูมิ 4 ˚C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากล้างครบ 3 ครั้ง จึงบ่มตะกอนใสที่ได้ด้วย AC ที่อุณหภูมิ 4 ºC เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้อนุภาคไวรัสค่อยๆ กระจายออกจากตะกอน เก็บส่วนสารน้ำสีขาวที่ -80 °C เพื่อการทดลองขั้นต่อไป

3.2.3. การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE

การตรวจสอบไวรัสที่แยกได้นั้นได้ดำเนินการบน SDS-PAGE ด้วย Bio-Rad Mini-Protein III system โดยการใช้สารจากการละลายตะกอนไวรัสปริมาตร 1 µL เจือจางในน้ำกลั่น 20 µL แล้วจึงผสมอนุภาคไวรัสที่เจือจางแล้วด้วย sample buffer และแยกด้วยเจล SDS-PAGE (12.5%) [มี separating gel ประกอบด้วย 2.6%C, 12%T, 0.375 M Tris-HCl (pH 8.8) และ 0.1% SDS; stacking gel ประกอบด้วย 2.6%C, 6%T, 0.125 M Tris-HCl (pH 6.8) และ 0.1% SDS] ด้วยความต่างศักดิ์คงที่ที่ 100V เป็นเวลาประมาณ 120 นาที ตรึงเจลอย่างน้อย 30 นาที ด้วย fixative solution [20% ethanol, 2% *ortho*-phosphoric acid ใน MilliQ water] ย้อมเจลที่ได้ด้วย Colloidal Coomassie Blue-250 [100 mL ของ 10% ammonium sulfate, 2% (w/w) phosphoric acid, 0.1% Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) ใน 400 mL Methanol] เป็นเวลา 1 คืน และล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำ

วิเคราะห์การก่อพันธะในโมเลกุลโปรตีนของไวรัสด้วยการแยกโปรตีนใน 12.5% SDS-PAGE โดยเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างไวรัส ที่บ่มและไม่บ่มกับสารทำลายพันธะไดซัลไฟล์ Dithiothreitol (DTT) 50 mM และ alkylated ด้วย Iodoacetamide (IAA) 100 mM ตรึงเจล 30 นาที ด้วย fixative solution ล้างเจลด้วยน้ำ และย้อมด้วย Colloidal Coomassie Blue-250

3.2.4 การวิเคราะห์ด้วย Western blot

การวิเคราะห์โปรตีน gp116 ของ YHV ด้วย Western blot ดำเนินการโดยแยกโปรตีนจาก YHV ด้วยวิธีตามข้อ 3 แล้วจึงถ่ายโปรตีนลงบนแผ่น PVDF ด้วยกระแสไฟฟ้า ป้องกันการเกิดการจับของแอนติบอดีโดยไม่จำเพาะโดยการบ่มด้วยหางนม 5% บัฟเฟอร์ TBS-T(0.1%) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วย primary antibody (mouse anti-YHVgp116, เจือจาง 1:5000) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออก 3 ครั้ง ด้วย บัฟเฟอร์ TBS-T(0.1%) และตามด้วย secondary antibody (HRP-conjugated Goat anti-mouse IgG, เจือจาง 1:10000) ล้างด้วยบัฟเฟอร์ TBS-T(0.1%) แล้วจึงตรวจสอบสัญญาณของโปรตีน ด้วย SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) และตรวจจับสัญญาณด้วยฟิล์มเอ็กเรย์ เป็นเวลา 30 วินาที

3.2.5 *In silico* digestion

การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศเพื่อคัดเลือกเอนไซม์โปรตีเอสที่จะใช้สำหรับย่อยโปรตีน gp116 ให้ได้ชิ้นเปปไทด์ขนาดเหมาะสำหรับการวิเคราะห์ด้วย Mass spectrometry โดย *in silico* digest โปรตีน gp116 ด้วย pepsin, trypsin, chymotrypsin และ trypsin/chymotrypsin โดยซอฟแวร์ออนไลน์ PeptideMass (http://www.expasy.org/tools/peptide-mass.html)

3.2.6 การแยกโปรตีน gp116 ออกจาก YHV ด้วย Ion-exchange chromatography

Column : CM-Sepharose FastFlow (GE-HealthCare) 1 mL

Elution : manual gradient elusion 0-1 M NaCl/20mM Tris-HCl, pH 7.0

ละลายอนุภาคไวรัสที่ได้จากข้อ 2 ในสารละลาย IEX-lysis buffer (4 M Urea, 20 mM Tris-HCl, pH 7.0) ตั้งทิ้งในน้ำแข็ง 15 นาที และ อุณหภูมิห้อง 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g 10 นาที ฉีดสารละลายโปรตีนที่ได้เข้าคอลัมน์ IEX ที่ใช้ ชะล้างคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 และชะโปรตีนจากคอลัมน์ด้วย

สารละลาย NaCl ที่ความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800 mM และ 1 M ในบัฟเฟอร์ 20 mM Tris-HCl, pH 7.0 ตามลำดับ แล้วตรวจสอบโปรตีนที่ถูกชะออกมาด้วย SDS-PAGE (12.5%)

3.2.7 การย่อยโปรตีน gp116 ด้วยเอนไซม์โปรตีเอสในเจล (*in-gel* digestion)

ตัดย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin (pH2, C-terminal to F/L/E), chymotrypsin (C-terminal to F/Y/W/L, not before P), trypsin (C-terminal to K/R, not before P), และ trypsin/chymotrypsin ใช้เวลาในการย่อยประมาณ 8-12 ชั่วโมง โดยแยกโปรตีน gp116 จากอนุภาคไวรัสด้วย 10% SDS-PAGE ในสภาวะที่ผ่านการบ่มด้วย iodoacetamide แต่ไม่เติม reducing agent หรือสารทำลายพันธะไดซัลไฟด์ โดยเตรียมเจล SDS-PAGE โดยระบบบัฟเฟอร์ของแผ่นเจลให้มี pH 7.5 ด้วย 1.5 M Tris-HCl, pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 10 ˚C ตรึงเจลนานไม่เกิน 30 นาที ด้วย fixative solution ล้างเจลด้วยน้ำ และย้อมด้วย Colloidal Coomassie Blue-250 ไม่เกิน 1 ชั่วโมง ตัดแถบโปรตีน gp116 ด้วยปลายเข็มฉีดยา (18G, Nipro, ประเทศไทย) หรือมีดผ่าตัดและตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็กๆ กำจัดสีย้อมและเกลือส่วนเกินออกด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น กำจัดสีย้อมที่ติดแน่นด้วย 50% acetonitrile ใน 50% 50 mM Ammonium acetate, pH 7.0 ซ้ำจนได้ก้อนเจลสะอาด ล้างก้อนเจลด้วย 100% Acetonitrile ประมาณ 15 นาที จึงกำจัดตัวทำละลายทิ้ง หยอดสารละลายเอนไซม์ 12.5 ng/µL ใน 25 mM Ammonium acetate, pH 7.0 สำหรับ trypsin และ chymotrypsin หรือ .ใน 3% formic acid, pH2 สำหรับ pepsin บ่มจนเนื้อเจลดูดซับสารลายเอนไซม์ได้เต็มที่เป็นเวลาประมาณ 30-45 นาที ในน้ำแข็ง กำจัดสารละลายส่วนเกินออก และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สำหรับโปรตีเอสแต่ละชนิดลงไปจนท่วมเนื้อเจล บ่มเจลผสมเอนไซม์ที่ 30˚C เป็นเวลาประมาณ 8-12 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลาจึงดูดเก็บสารละลายใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ สกัดเปปไทด์จากเนื้อเจล 2-3 ครั้งด้วย 50% acetonitrile ใน 5% formic acid สลับกับ 1% formic acid ใน nanopure water ตามด้วย 80% acetonitrile ใน 5% formic acid ใน nanopure water อีก 2 ครั้ง และร่วมด้วยการใช้คลื่นเสียงใน ultrasonic bath ในรอบสุดท้าย แล้วจึงรวมเปปไทด์ที่สกัดได้ทั้งหมดเข้าด้วยกัน และแบ่งเป็นสองส่วนเท่ากันเพื่อการเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่เติมและไม่เติม DTT ระเหยตัวทำละลายจนแห้งโดยใช้ vacuum concentrator แบ่งหนึ่งชุดตัวอย่างบ่มด้วย 50 mM DTT ใน 25 mM Ammonium bicarbonate pH 8.0 เป็นเวลา 30 นาที ที่ 35 ˚C จึงบ่มต่อด้วย 100 mM IAA ใน 25 mM Ammonium bicarbonate pH 8.0 ในที่มืดอีก 30 นาที เจือจางเปปไทด์ด้วย 1% formic acid จนได้ปริมาตร 100 µL กำจัดเกลือจากเปปไทด์ด้วย ZipTip ® (MilliPore) ตามคู่มือของผลิตภัณฑ์

3.2.8 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค mass spectrometry (MS) และการสืบค้นข้อมูล

ส่งตัวอย่างเปปไทด์ที่สกัดได้วิเคราะห์ด้วย mass spectrometer ณ หน่วยบริการเครื่องมือวิทยาศาสตร์

3.2.8.1 Matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time of flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometry

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ด้วย MALDI-TOF/TOF ที่ The Mass Spectrometry Lab of the Nevada Proteomics Center, School of Medicine, University of Nevada, Reno, USA ด้วยเครื่อง ABI 4700 MALDI TOF/TOF (Applied Biosystems) เตรียมเปปไทด์สำหรับวิเคราะห์โดยหยอดสารละลายเปปไทด์ลงบน target plate แล้วหยอดทับ (overlay) ด้วย 0.5 µl ของ 5 mg/ml α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix และ 10 mM ammonium phosphate เก็บข้อมูลการวิเคราะห์ในโหมด reflectron mode ในช่วงมวล 700–

4,000 ดาลตัน โดยแต่ละสเปคตรัมได้จากการเฉลี่ยข้อมูลการยิงเปปไทด์ด้วยเลเซอร์จำนวน 1,250 ครั้ง แต่ละสเปคตรัมใช้เปปไทด์ที่เกิดจาก trypsin autolysis (m/z 2211.11) เป็น internal calibration peak เลือกเปปไทด์อิออนประมาณ 8-20 อิออน เป็น precursor ion เพื่อวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค MS/MS ซึ่งวิเคราะห์ในช่วง m/z 70-precursor ion โดยใช้ window ของการวิเคราะห์ในช่วง -1 ถึง 3 Da แต่ละสเปคตรัมของ MS/MS spectrum ได้จากการเฉลี่ยค่า 5,000 ครั้ง ข้อมูลทั้งหมดถูกวิเคราะห์ บน Oracle database และ ใช้ GPS Explorer (Applied Biosystems) สำหรับการสร้าง peak list ของแต่ละตัวอย่างในรูปแบบไฟล์ *.mgf หรือ *.txt

3.2.8.2 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ณ ศูนย์เครื่องมือรวมศูนย์ศาลายา สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ด้วย nanoliquid chromatography coupled electrospray ionization tandem mass spectrometry (nanoLC-ESI-MS/MS) โดยใช้เครื่อง Dionex Ultimate 3000 HPLC system พ่วงกับ maXis Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) Mass Spectrometer (Bruker Daltonics) เก็บข้อมูลการวิเคราะห์ในช่วง m/z 500-3000 และประจุของอิออนเป็น 1^+, 2^+ and 3^+ ตามลำดับ ใช้เปปไทด์ที่เกิดจาก typsin autolysis (m/z = 421.22, 2^+) สำหรับการ calibration และบ่งบอกความแม่นยำของการวิเคราะห์ แปลงข้อมูล MS/MS ให้อยู่ในไฟล์ *.mgf เพื่อใช้สำหรับการสืบค้นข้อมูลโปรตีน

3.2.8.3 การสืบค้นข้อมูล

ใช้ไฟล์ MS สำหรับสืบค้นพิสูจน์ชนิดโปรตีนด้วย Mascot (http://www.matrixscience.com) ปรับตั้งค่าการสืบค้น (MS/MS Ion Search) โดยกำหนด MS mass tolerance ไม่เกิน 2.02 Da และใช้ MS/MS ion mass tolerance 0.6-0.8 Da; max missed cleavages = 1-4 หรือปรับจนถึง 9 แล้วแต่กรณี กำหนด Variable modifications เป็น Dehydro (C), Gln->pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M) โดยใช้ฐานข้อมูล NCBInr (Viruses) ยอมรับผลการสืบค้นเมื่อมีโปรตีนที่ได้คะแนนสูงสุด ($p < 0.05$)

3.2.9 การวิเคราะห์การเกิดพันธะไดซัลไฟด์

วิเคราะห์การก่อพันธะไดซัลไฟด์โดยใช้ข้อมูลจาก MS และลำดับกรดอะมิโนของ gp116 ที่จัดไฟล์ในรูปแบบที่เหมาะสม เช่น fasta file หรือ text file หรือตามความต้องการของโปรแกรมออนไลน์ที่ใช้ อาทิ Mascot (http://www.matrixscience.com), MS-Bridge (http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msbridgestandard), MassMatrix (http://www.massmatrix.com), MS2DB^{++} (http://haddock2.sfsu.edu/~ms2db/ms2db++/methods.php) และ http://prowl.rockefeller.edu/prowl/peptidemap.html โดยกำหนด mass tolerance ไม่เกิน 2.02 Da และใช้ MS/MS ion mass tolerance 0.6-0.8 Da; max missed cleavages = 0 หรือปรับจนถึง 9 แล้วแต่กรณี กำหนด Variable modifications เป็น Dehydro (C), Gln->pyro-Glu (N-term Q), Oxidation (M), Carbamidomethyl C และวิเคราะห์ยืนยันการมีอยู่จริงของคู่เปปไทด์ที่ก่อพันธะไดซัลไฟด์กันที่ได้โดยตรวจสอบซ้ำกับผลที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เติม DTT และ alkylated ด้วย iodoacetamide ด้วย Mascot หรือ MassMatrix

บทที่ 4
ผลการวิจัยและการวิจารณ์ผล

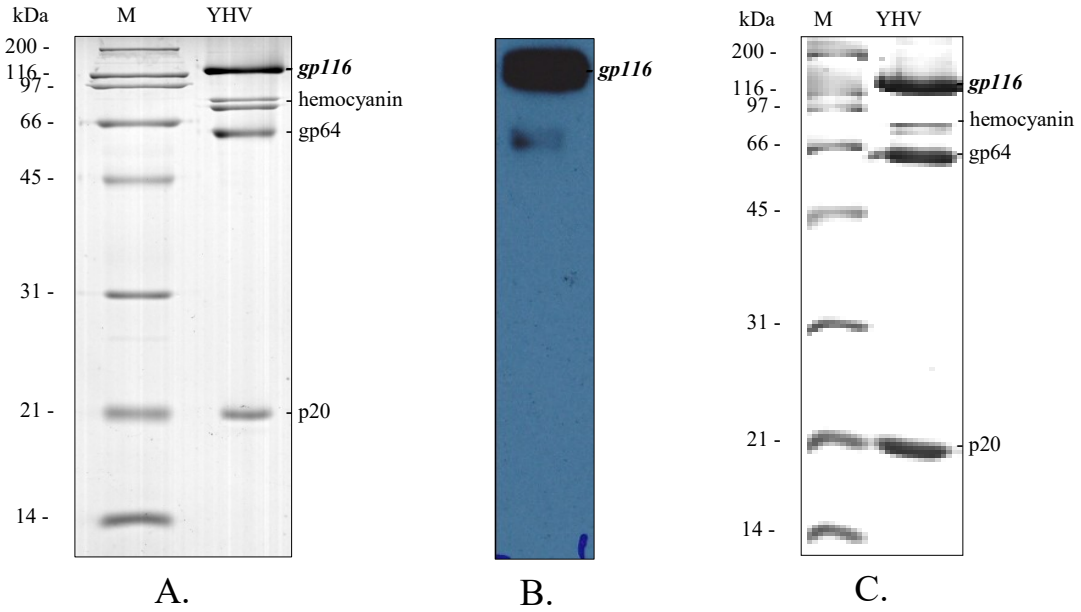
4.1 การเพิ่มจำนวนไวรัสในกุ้งกุลาดำทดลองและการเตรียมไวรัสบริสุทธิ์

ไวรัสก่อโรคหัวเหลืองในกุ้ง (YHV) นั้นนอกจากจะขยายเพิ่มจำนวนตามปกติเมื่อเกิดการติดเชื้อในกุ้งตามธรรมชาติหรือในกุ้งที่เลี้ยงในบ่อเลี้ยงของเกษตรกรแล้ว ยังสามารถขยายเพิ่มจำนวนในห้องทดลองอย่างรวดเร็วและปริมาณมากได้ โดยทำได้ทั้งการฉีดเชื้อเข้าตัวกุ้ง (38) หรือเพาะเลี้ยงในเซลล์ปฐมภูมิ (39) ในการวิจัยนี้ได้เลือกใช้วิธีการฉีดหัวเชื้อไวรัสเข้าตัวกุ้งกุลาดำทั้งที่จับได้จากทะเลโดยชาวประมง หรือที่ซื้อมาจากเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งผ่านพ่อค้ากุ้งกุลาดำเป็น การฉีดหัวเชื้อ YHV ตามปริมาณดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในวิธีการทดลองนั้น ทำให้กุ้งกุลาดำที่ได้รับการฉีดไวรัสแสดงอาการติดเชื้ออย่างชัดเจนในห้องทดลองหลังได้รับเชื้อประมาณ 24-30 ชั่วโมง คือกุ้งที่ได้รับการฉีดเชื้อ YHV มีอาการระแวงและไวต่อสิ่งเร้าทั้งแสงและเสียงแปลกไปจากกุ้งที่ไม่ได้รับเชื้อ ในช่วงประมาณ 12-16 ชั่วโมงแรกหลังได้รับการฉีดเชื้อไวรัส และตั้งแต่ 24 ชั่วโมงหลังได้รับการฉีดเชื้อไวรัสกุ้งเริ่มอยู่นิ่งกับที่ ไม่ว่ายน้ำ ตัวมีสีซีดลงอย่างเห็นได้ชัด เหงือกมีกิจกรรมน้อยลง และมีสีออกเหลืองซีด หลังจากนั้นจึงเริ่มตาย เมื่อดูดน้ำเลือดจากกุ้งที่ติดเชื้อพบว่าเลือดมีสีจางลงเมื่อเทียบกับกุ้งปกติหรือกุ้งที่ไม่ฉีดเชื้อ และนอกเหนือจากนั้นเมื่อสังเกตตะกอนที่ได้หลังการปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดเซลล์เม็ดเลือดและเศษอื่นๆ ที่ไม่ต้องการพบว่าตะกอนที่ได้จากตัวอย่างน้ำเลือดของกุ้งที่ได้รับการฉีดเชื้อ YHV มีปริมาณน้อยกว่าน้ำเลือดของกุ้งที่ไม่ฉีดเชื้อ (ไม่แสดงผล)

เพื่อประสิทธิภาพการวิเคราะห์จึงจำเป็นต้องเตรียมไวรัส YHV ที่มีการปนเปื้อนของโปรตีนชนิดอื่นๆ น้อยที่สุด เพื่อจะได้ง่ายต่อการวิเคราะห์และแปลผลการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometry ซึ่งเป็นเทคนิคที่ไวต่อโปรตีนปนเปื้อนมาก วิธีการเตรียมไวรัส YHV ที่ค่อนข้างบริสุทธิ์ตามที่มีรายงานมีสองวิธี คือ วิธี Urografin gradient ultracentrifugation ตามรายงานของ Wongteerasupaya และคณะ (40) และ วิธีของ Soowannayan และคณะ (7) ซึ่งทั้งสองวิธีจำเป็นต้องใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิด ultracentrifuge (UC) ซึ่งไม่มีเครื่องมือชนิดนี้ในหน่วยงานของผู้วิจัย อีกทั้งวิธีของ Wongteerasupaya และคณะ นั้นจำเป็นต้องใช้สารเคมีชนิดพิเศษชื่อ Urografin ® ซึ่งเดิมผลิตโดย Schering AG (ปัจจุบันคือ Bayer Schering Pharma AG) และไม่สามารถจัดซื้อได้ ในโครงการวิจัยนี้จึงได้พัฒนาวิธีการเตรียมไวรัส YHV อย่างง่าย ใช้เครื่องมือที่ถือว่ามีในห้องปฏิบัติการทางอณูชีววิทยา ราคาไม่แพงและไม่ต้องใช้สารเคมีพิเศษใดๆ โดยการปั่นเหวี่ยงสารน้ำที่ได้จากน้ำเลือดของกุ้งที่ได้รับการฉีดเชื้อไวรัสตั้งต้น (ข้อ 3.2.2) ในหลอด microcentrifuge ขนาด 2 mL ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะความเร็วรอบ 18,626-20,800 xg ตามรุ่นของเครื่องและหัวปั่นเหวี่ยง ซึ่งหลังจากปั่นเหวี่ยงแล้วเป็นเวลา 30 นาที พบว่ามีตะกอนคล้ายเมือกใสที่ก้นหลอด microcentrifuge และส่วนของชั้นน้ำยังคงมีสีคล้ายเดิม ต่างจากการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง ultracentrifuge ที่ให้ตะกอนสีคล้ำถึงดำและชั้นน้ำมีลักษณะใสไม่มีสี หลังจากล้างตะกอนใสที่ได้แล้ว 2-3 ครั้ง พบว่าตะกอนที่ได้มีลักษณะโปร่งแสงมากขึ้น ไม่แสดงสีที่ชัดเจน แต่หลังจากบ่มในสารละลาย AC เป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่าได้เป็นสารละลายสีขาวขุ่น และขุ่นมากขึ้นเมื่อบ่มต่อไปอีกจนครบ 48 ชั่วโมง ลักษณะการเปลี่ยนสีนี้คล้ายกับที่สังเกตได้จากการทำบริสุทธิ์ไวรัส

YHV ตามวิธีการของ Wongteerasupaya และคณะ ที่เตรียมได้ก่อนหน้านี้ (38) หลังจากได้ตรวจสอบสารขุ่นที่ได้ด้วย SDS-PAGE ได้ผลการทดลองดัง **รูปที่ 4** ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าไวรัส YHV ที่แยกได้มีโปรตีนองค์ประกอบหลักของอนุภาคไวรัสเหมือนกับที่รายงานโดย Jirapakdee และคณะ (6) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 3 ชนิด มีขนาดโมเลกุล 116, 64 และ 20 kDa ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ไวรัสด้วยวิธี Western blot ก็ยืนยันว่าโปรตีนขนาด 116 kDa ให้ผลเป็นบวกอย่างชัดเจนด้วยแอนบอดีต่อ gp116 เป็นการยืนยันอีกทางหนึ่งว่าอนุภาคไวรัสที่แยกได้เป็นเชื้อไวรัส YHV จริง **(รูปที่ 4)**

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการแยกไวรัส YHV ให้บริสุทธิ์สามารถดำเนินการได้อย่างง่ายๆ ได้คุณภาพของไวรัสเทียบเท่ากับที่ใช้เทคนิค Urografin-gradient ultracentrifugation การปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดตั้งโต๊ะ (microcentrifuge) ตามที่รายงานนี้ยังมีข้อดีด้านการลงทุนครุภัณฑ์ที่ราคาถูกกว่า ใช้เวลาในการดำเนินการน้อยกว่า และไม่จำเป็นต้องใช้ผู้มีความชำนาญด้านการใช้เครื่อง UC และเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างวิธีเตรียมไวรัส YHV โดยใช้ microcentrifuge นี้กับวิธี Urografin gradient ultracentrifugation สารขุ่นที่ได้จากการละลายตะกอนใสนั้น ประกอบด้วยอนุภาคไวรัส YHV ปริมาณมาก เมื่อสังเกตจาก SDS-PAGE ยังจะเห็นได้ว่ามีโปรตีนชนิดอื่นปนเปื้อนน้อยมาก ซึ่งมีโปรตีนที่ปนอยู่อย่างชัดเจนนั้นมีเพียง 2 แถบ ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 68-70 kDa ซึ่งตรงกับขนาดโมเลกุลของ hemocyanin และรูปแบบการปนเปื้อนเหมือนกันในทุกวิธีการทำบริสุทธิ์ YHV ที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (6, 7)



รูปที่ 4 การวิเคราะห์โปรตีนองค์ประกอบของอนุภาคไวรัส YHV ที่แยกได้

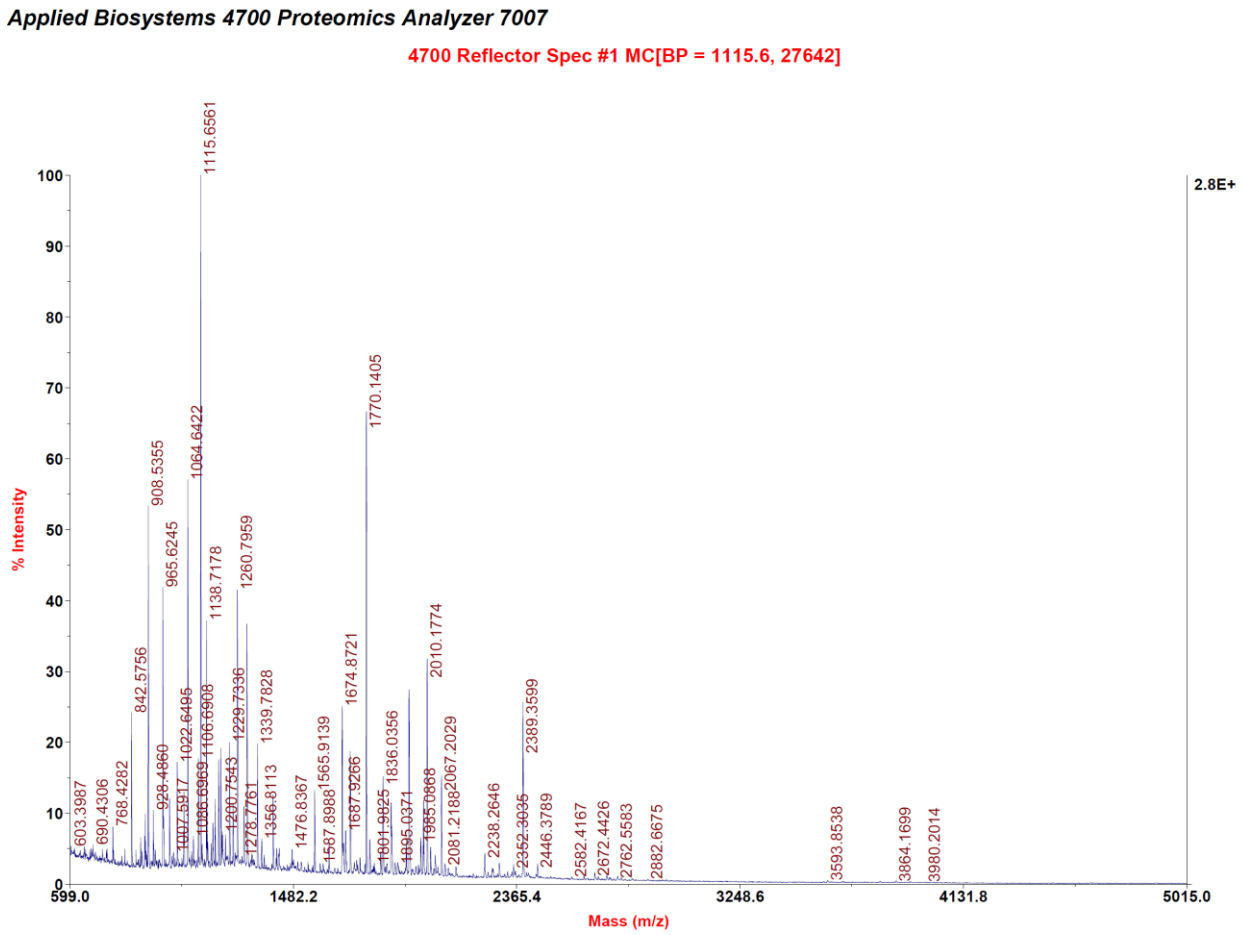
A. SDS-PAGE ของไวรัสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 20,800 xg

B. การวิเคราะห์ Western blot ของไวรัสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 20,800 xg ด้วยแอนติบอดีต่อ gp-116 (1:5,000)

C. การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของไวรัสที่ได้จาก Urografin-gradient ultracentrifugation ตามวิธีของ Wongteerasupaya และคณะ (40) โดยผู้วิจัย (38)

การปนเปื้อนของโปรตีน hemocyanin นี้ไม่น่าจะมีผลกระทบต่อการวิเคราะห์ในขั้นต่อไปเพราะโปรตีนนี้มีขนาดโมเลกุลที่แตกต่างจากโปรตีนเป้าหมายอย่างชัดเจน อีกทั้งสามารถแยกโปรตีน hemocyanin นี้ออกจากโปรตีนเป้าหมายได้ง่ายๆ โดยวิธี SDS-PAGE

การวิเคราะห์โปรตีนขนาด 116 kDa ที่ปรากฏบน SDS-PAGE โดยการใช้เทคนิค *in-gel* digestion ด้วยเอนไซม์ trypsin และ MALDI-TOF MS และ nanoLC-MS/MS ร่วมกับการสืบค้นข้อมูล แสดงให้เห็นว่าแถบโปรตีนนี้ คือ gp116 ของ YHV จริง ด้วยคะแนนการสืบค้นด้วย Mascot (http://www.matrixscience.com).ที่สูง (**รูปที่ 5**) และมีชิ้นเปปไทด์ที่กระจายครอบคลุมโปรตีน gp116 อย่างดี (ตารางที่ 2)



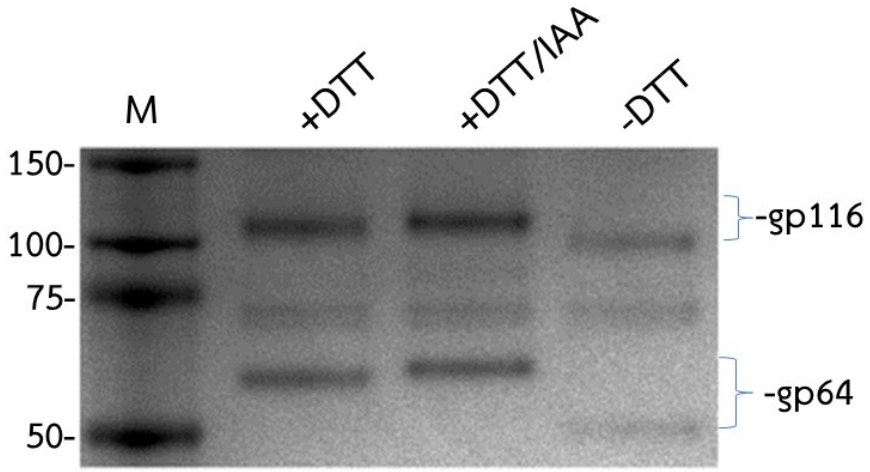
รูปที่ 5 การวิเคราะห์โปรตีนขนาด 116 kDa ด้วย MALDI-TOF

ตารางที่ 2 Observed m/z เปปไทด์ และตำแหน่งที่มีลำดับกรดอะมิโนตรงกับโปรตีน gp116 ของ YHV

m/z $(m+H)^+$	เปปไทด์	ตำแหน่งเปปไทด์ที่วิเคราะห์ได้จาก MALDI-TOF
642.3738	ITPIAK	TILSGIPEKDKSVLMAPHVLFEAGQPTEPPDCI
677.4128	QQFVR	HWAANGDCFCNSTNCDWSEHVQTLCPQTCNTSS
878.4875	FSICSHK	PTTTSSATQSLPSSTPSSDADNPCVAQDDAGCY
894.4432	DYDYYR	SYLNDYDESKRTQAIKYTYTLSTKNTPHMNAIL
896.4962	TWAAEYR	TTEQFEEMSLDEARYSDIVSLYRINNITSVPGC
908.5355	FFIYYR	MYNPVSYYLHGDSVPVTCPSTPRSFGTTYNHQI
965.6245	TLATHLGPR	SSQILYNHKMVNVTVDQRCKTHSDNCWAYYNKA
968.5930	FGNGLYLGK	SKSIFIQFHPSYAQKYHNRILEPTTLIIPFYPP
992.6324	HLPHFLTK	RDTKTLATHLGPRVFRNAGDYQIFLEPGWLGR*T*
1064.6417	RFFIYYR	*YLDGYSYHEIYASTR*HDCRYNMMSGDNKYGINL
1086.6964	HKPYTSILK	GDDVLHETIPTPRGYTPSVVVCGTTFTYYKLHD
1115.6539	YSDIVSLYR	AVKLPWESVQYTDIEDIPAGFRDPYDFSVDTPS
1186.7263	IYIHSPMLGR	GPVTISVLEEYHDGDSIRETAPKRFFIYYRIMT
1298.7679	TTYLGYTVPQR	ARLTPSQVEHLNLSTHATSSWAAENYISNCYVV
1339.7828	AQTRPGVCPTPR	RQQFVRNTHPFSFALSYIDYNVTAGSVVRCNEF
1565.9139	SIFIQFHPSYAQK	NIQMDLLLATFGTATRTWAAEYRHLPHFLTKRG
1674.8721	YQGLCYEVDWSVR	FYPLEPVTGSAIDYLIVEYNAHASR*YSHQATYH*
1687.9266	IPYDGPHSVTCINSK	*QFGHPVAK*AQTRPGVCPTPRSIRYQGLCYEVDW
1770.1405	ILEPTTLIIPFYPPR	SVR*SPTPPISGYPDIGTYTSGYIFR*DYDYYRFK
1836.0356	NAGDYQIFLEPGWLGR	PKFGNGLYLGKVSAAASIGTYSKCGKAQSISPY
1868.0283	MQCSRSFTMHFSSFR	HDHGINTDLGTPVYDSACDSAAYTIPVVKYNGP
1871.0337	YSHQATYHQFGHPVAK	YSLGVPDVSCEIHDETLTCGTNSTFRFSICSHK
1939.0275	TYLDGYSYHEIYASTR	IPYDGPHSVTCINSKDNKVHVVKQPGYSYYIAG
2010.1769	YGINLGDDVLHETIPTPR	DPGALHISHNKHKPYTSILKDQINLFHFSYLYQ
2389.3596	SPTPPISGYPDIGTYTSGYIFR	AVAMLFGSLGYFIFGLYVTLFILTTLWANIKYI
		FYAKTTYLGYTVPQRFMAGKTTGCKMCGLDTKH
		LKIHARHHKIYIHSPMLGRTFFLWSPIYAILLL
		SIISPASA

4.2 ผลของ reducing agent ต่อโปรตีนโครงสร้างของ YHV

เพื่อยืนยันว่า YHV ที่เตรียมได้นั้นมีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลโปรตีนโครงสร้างของอนุภาคไวรัส จึงได้ทดลองผสมสารทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (reducing agent) กับสารละลายอนุภาค YHV ที่เตรียมได้ (10 µg) โดยใช้ 1,4-dithio-D-threitol (DTT) หรือ DTT แล้ว alkylated ด้วย Iodoacetamide และเปรียบเทียบการเคลื่อนที่ในเจล SDS-PAGE กับโปรตีนของไวรัสที่ไม่ได้เติม reducing agnet ผลการทดลองแสดงดัง**รูปที่ 6** ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลของโปรตีน gp116 จริง โดย gp116 ที่ไม่เติม DTT สามารถเคลื่อนที่ผ่าน gel matrix ได้เร็วกว่าตัวอย่างที่เติม DTT อย่างชัดเจน การทดลองนี้แสดงให้เห็นเพิ่มเติมว่าไม่มีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลของ gp116 และ gp116 อย่างที่ Jitrapakdee และคณะได้รายงานไว้ และตรงตามที่ผู้วิจัยได้ค้นพบก่อนหน้านี้ ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของ gp64 อาจจะประเมินได้คร่าวๆ ว่า gp116 มี mass shifted ต่ำกว่า gp64 ซึ่งอาจใช้ประกอบการระบุระยะตำแหน่งของการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ใน gp116 ได้ กล่าวคือ การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุล gp116 อาจมีจำนวนน้อยกว่าที่คาดการ คือสูงสุด 13 พันธะ และอาจมีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ระหว่าง cysteine .ในระยะตำแหน่งกรดอะมิโนที่ใกล้กัน ไม่ใช่เป็นการเกิดจากกรดอะมิโนที่ตำแหน่งห่างกันมาก มีผลทำให้กระทบเชิงโครงสร้างหลังบ่มกับ reducing agent ไม่มากจึงทำให้รบกวนการเคลื่อนที่ในเนื้อเจล SDS-PAGE ไม่มากอย่างที่คาดการ



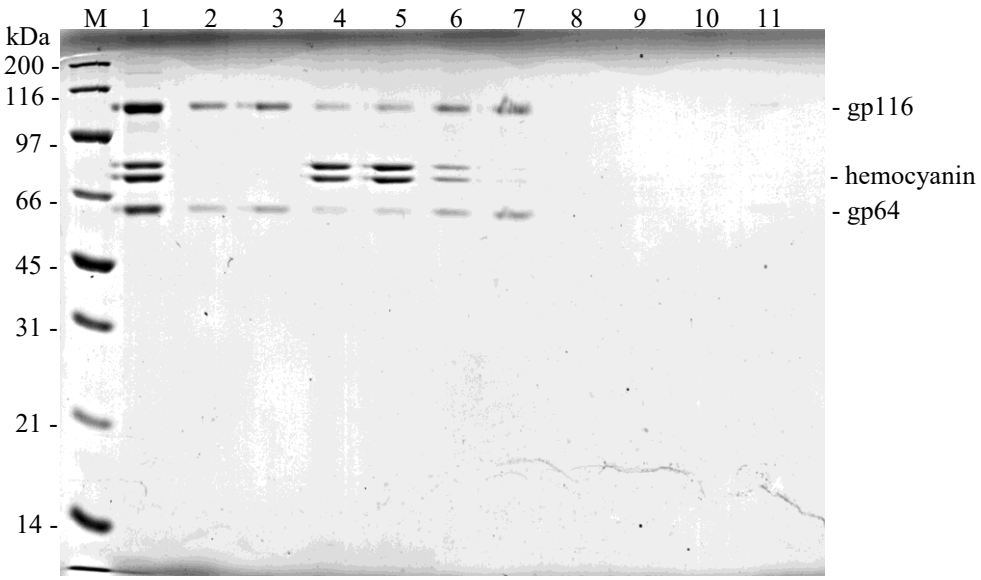
รูปที่ 6 การเคลื่อนที่ของ gp116 บน SDS-PAGE (12.5%) ในสภาวะที่บ่มและไม่บ่มกับ reducing agent

4.3 การแยกโปรตีน gp116 บริสุทธิ์

เพื่อจะให้ได้โปรตีน gp113 บริสุทธิ์เพื่อการวิเคราะห์ต่อด้วย mass spectrometry โดยปราศจากการรบกวนจากโปรตีนปนเปื้อนชนิดอื่นๆ ที่ไม่พึงประสงค์ จึงได้ทดลองแยกบริสุทธิ์ประตีน gp116 ด้วยวิธีทางโครมาโตกราฟีแบบคอลัมน์ จึงได้ทดลองดำเนินการด้วย โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน ด้วย DEAE-sepharose แต่อย่างไรก็ตามไม่สามารถแยกโปรตีน gp116 ให้บริสุทธ์โดยวิธีนี้ได้ **รูปที่ 7** และเมื่อใช้วิธี gel filtration chromatography พบว่าไม่มีโปรตีนใดถูกชะออกจากคอลัมน์ได้เลย (ไม่แสดงผลการทดลอง) และเนื่องจากได้แสดงให้เห็นแล้วว่าสามารถใช้วิธีการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และ *in-gel* digestion ได้ดังกล่าวแล้วข้างต้น จึงไม่ได้ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับทำบริสุทธิ์ gp116 ต่อ และปรับใช้การแยก gp116 ด้วย SDS-PAGE ในสภาวะไม่เติม DTT สำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

4.4 การวิเคราะห์เพื่อคัดเลือกเอนไซม์สำหรับย่อยโปรตีน gp116 จาก YHV

ถึงแม้ว่า mass spectrometry จะเป็นเครื่องมือที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนได้ดี แต่กระบวนการสำคัญก่อนการวิเคราะห์ คือ ต้องย่อยโปรตีน การคัดกรองเบื้องต้นเพื่อเลือก proteolytic enzyme สำหรับใช้ในการย่อยโปรตีน gp116 ให้ได้ขนาดชิ้นเปปไทด์ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์โปรตีนด้วย Mass spectrometry นั้น ได้วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม PeptideMass (http://web.expasy.org/peptide_mass/) โดยได้เลือกใช้โปรตีเอสเพียง 3 ชนิดคือ trypsin chymotrypsin และ trypsin/chymotrypsin ได้ผลดังแสดงใน **ตารางที่ 3, 4, และ 5** (แสดงเฉพาะเปปไทด์ที่มี Cysteine) ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า chymotrypsin และเอนไซม์ผสม trypsin/chymotrypsin ให้ผลการตัดย่อยที่เหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วย MS ต่อไปได้ แม้จะมีบางเปปไทด์ที่มีมวลมากเกินกว่า 3,000 Da ก็ตาม คือ ให้ผลการตัดย่อยเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ขนาดไม่เกิน 3,000 Da ส่วนการตัดย่อย gp116 ด้วย trypsin นั้น แม้จะได้เปปไทด์โมเลกุลใหญ่ส่วนอยู่หนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามก็ยังคงใช้ trypsin ในการย่อยเพื่อยืนยันการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ใน gp116 ร่วมกันกับเอนไซม์ที่เหลือได้



รูปที่ 7 SDS-PAGE (12.5%) ของโปรตีนจาก YHV ที่ชะออกจาก DEAE-sepharose column ด้วยสารละลาย NaCl ที่ความเข้มข้นต่างๆ

(M= โปรตีนมาตรฐาน ขนาดโมเลกุลดังแสดงด้านซ้ายมือ, 1= YHV ก่อนผ่านคอลัมน์, โปรตีนที่ถูกชะจากคอลัมน์ด้วย NaCl ความเข้มข้นต่างๆ (mM) คือ 2= 50, 3= 100, 4= 200, 5= 300, 6= 400, 7= 500, 8= 600, 9= 800, 10= 1000 และ 11= โปรตีนที่ถูกชะออกมาขณะล้างคอลัมน์ (0 mM NaCl)

4.5 การก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน gp116

การมีพันธะไดซัลไฟด์นั้นนอกจากจะช่วยเสริมความคงตัวเชิงโครงสร้างของโปรตีนแล้ว ยังช่วยจำกัดการม้วนพับ (folding) ในลักษณะที่ลดความสุ่มในความเป็นไปได้สำหรับการม้วนพับเป็นโครงสร้างสามมิติที่เหมาะสมสำหรับการทำหน้าที่ทางชีวภาพ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการลดเวลาและเพิ่มประสิทธิภาพของการม้วนพับให้เกิดได้รวดเร็วมากยิ่งขึ้น การศึกษาการก่อพันธะไดซัลไฟด์จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่ใช้อธิบายสมบัติเชิงโครงสร้างของโปรตีนได้ เมื่อมีการก่อพันธะระหว่าง cysteine .ใดๆ 2 residues ดังสมการ -S-H + -S-H → -S-S- จะมีผลให้ชิ้นเปปไทด์ที่ก่อพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกันมีมวลลดลง 2.02 Da ในลักษณะ $m_1+m_2-2.02$ หรือหากมีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ภายในชิ้นเปปไทด์ก็จะทำให้ชิ้นเปปไทด์นั้นมีมวลลดลง 2.02 Da ($m_i-2.02$) เช่นเดียวกัน (41) เนื่องจากมีการสูญเสีย H (dehydrogenation) ไประหว่างการก่อพันธะ การใช้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วย MS ผสานกับการสืบค้นข้อมูลจากฐานข้อมูลโปรตีนหรือโดยตรงต่อโปรตีนที่สนใจทำให้สามารถวิเคราะห์ตำแหน่งการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนได้ มีโปรแกรมสืบค้นหลายโปรแกรมได้ถูกคิดค้นขึ้นมาให้ใช้งานสำหรับการวิเคราะห์การก่อพันธะไดซัลไฟด์ของเปปไทด์หรือโปรตีนร่วมกับข้อมูลจากการวิเคราะห์ด้วย MS ดังกล่าวมาแล้วในส่วนของวิธีการ เช่น xQuest (42), Mascot, MassMatrix (43), MS-Bridge หรือ $MS2DB^{++}$ (44) เป็นต้น **ตารางที่ 6** เป็นผลที่ได้จากสืบค้นข้อมูลการวิเคราะห์ gp116 ด้วย MS ร่วมกับโปรแกรมวิเคราะห์ที่กล่าวมา ที่ระดับความเชื่อมั่นไม่น้อยกว่า p=0.05

จากการวิเคราะห์ที่ใช้ทั้งผลจาก MS/MS ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์มากกว่าหนึ่งชนิด คือ trypsin chymotrypsin และเอนไซม์ผสมระหว่าง trypsin และ chymotrypsin (Tryp/Chymo) ร่วมกับการใช้โปรแกรมประมวลผลต่างๆ ที่มีรายงานว่าเหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ตำแหน่งการเกิดพันธะไดซัลไฟล์ในโปรตีนนั้น แสดงให้เห็นว่าแม้ gp116 จะมี cysteine ในโมเลกุลมากถึง 26 ตำแหน่ง ซึ่งอาจก่อพันธะไกซัลไฟด์ได้ทั้งหมดมากถึง 13 พันธะ จากการวิเคราะห์ทั้งหมดรวมกัน พบว่ามีเพียง 3 พันธะ ที่มีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกัน ดังสรุปใน**ตารางที่ 6** และเมื่อพิจารณาตำแหน่งการเกิดพันธะไดซัลไฟด์โดยภาพรวมอาจจะกล่าวได้ว่าเป็นการก่อพันธะไดซัลไฟด์ที่เกิดระหว่างกรดอะมิโน cysteine ที่ไม่ได้อยู่ในตำแหน่งที่ห่างกันมาก และเมื่อย้อนไปพิจารณาร่วมกับลักษณะการเคลื่อนที่ใน SDS-PAGE ซึ่งมี mass shifted ที่ไม่สูงมาก ก็สามารถสรุปรวมกันได้คือเมื่อบ่มโปรตีน gp116 ด้วย reducing agent ในระบบที่มี SDS เป็น denaturing agent เพื่อทำลายพันธะไดซัลไฟด์แล้วไม่ได้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนรูปร่าง denaturing form ของโปรตีนอันกระทบต่อการเคลื่อนที่ใน SDS-PAGE มาก แต่ก็ยังอยู่ในระดับที่สังเกตได้

ตารางที่ 3 Calculated m/z และเปปไทด์จาก gp116 ที่ย่อยด้วย trypsin (C-terminal to R, K not before P) แสดงเฉพาะสายที่มีกรดอะมิโน Cysteine

No.	$[M+H]^+$	Position	Peptide sequence
1	10461.4	12-109	SVLMAPHVLFEAGQPTEPPD CIHWAANGDCFCNSTNCDWS EHVQTLCPQTCNTSSPTTTS SATQSLPSSTPSSDADNPCV AQDDAGCYSYLNDYDESK
2	3805.8	654-689	AQSISPYHDHGINTDLGTPV YDSACDSAAYTIPVVK
3	3590.73	432-463	LTPSQVEHLNLSTHATSSWA AENYISNCYVVR
4	3581.69	156-188	INNITSVPGCMYNPVSYYLH GDSVPVTCPSTPR
5	3275.46	690-719	YNGPYSLGVPDVSCEIHDET LTCGTNSTFR
6	2258.09	492-511	CNEFNIQMDLLLATFGTATR
7	1885.9	344-360	GYTPSVVVCGTTFTYYK
8	1630.79	727-741	IPYDGPHSVTCINSK
9	1617.74	585-597	YQGLCYEVDWSVR
10	1501.62	219-230	THSDNCWAYYNK
11	1282.67	570-581	AQTRPGVCPTPR
12	821.397	720-726	FSICSHK
13	767.343	851-857	MCGLDTK
14	530.214	313-316	HDCR
15	509.239	846-850	TTGCK
16	307.143	651-653	CGK
17	250.122	217-218	CK

ตารางที่ 4 Calculated m/z และเปปไทด์จาก gp116 ที่ย่อยด้วย Chymotrypsin (C-terminal to F/Y/W, not before P) แสดงเฉพาะสายที่มีกรดอะมิโน Cysteine

No.	$[M+H]^+$	Position	Peptide sequence
1	4990.09	51-99	SEHVQTLCPQTCNTSSPTTT SSATQSLPSSTPSSDADNPC VAQDDAGCY
2	3650.82	721-753	SICSHKIPYDGPHSVTCINS KDNKVHVVKQPGY
3	3178.64	842-869	MAGKTTGCKMCGLDTKHLKI HARHHKIY
4	2956.3	691-718	NGPYSLGVPDVSCEIHDETL TCGTNSTF
5	2788.34	649-674	SKCGKAQSISPYHDHGINTD LGTPVY
6	2515.14	205-225	NHKMVNVTVDQRCKTHSDNC W
7	2391.28	564-585	GHPVAKAQTRPGVCPTPRSI RY
8	1799.87	174-190	LHGDSVPVTCPSTPRSF
9	1579.68	22-35	EAGQPTEPPDCIHW
10	1467.71	155-167	RINNITSVPGCMY
11	1395.67	483-495	NVTAGSVVRCNEF
12	1110.55	346-356	TPSVVVCGTTF
13	1108.5	309-317	ASTRHDCRY
14	942.308	43-50	CNSTNCDW
15	902.32	675-683	DSACDSAAY
16	697.261	36-42	AANGDCF
17	599.249	456-460	ISNCY
18	583.254	586-590	QGLCY

การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่าง Cys_{849} และ Cys_{852} นั้น สัมพันธ์กับรูปแบบการฝังตัวบนเยื่อหุ้มอนุภาคไวรัสของ gp116 ตามรายงานของ Jitrapakdee และคณะ (6) Cysteine ตำแหน่งที่ 849 และ 852 นั้นถูกกั้นด้วยเยื่อหุ้มที่ทำหน้าที่เป็นโปรตีนเปลือกของ YHV ทำให้ Cysteine ทั้งสองตำแหน่งนี้ถูกแยกจาก Cysteine ตำแหน่งอื่นๆ และมาก่อพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกันได้

การวิเคราะห์ผลการก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีน gp116 ของ YHV ในโครงการวิจัยนี้ แม้จะได้พยายามปรับสภาวะการวิเคราะห์ซ้ำและค่อนข้างหลากหลายวิธีซึ่งไม่ได้กล่าวรายละเอียดในรายงานฉบับนี้ ก็ยังมี Cysteine อีกหลายตำแหน่งที่ไม่ปรากฏในการวิเคราะห์ครั้งนี้แม้จะขยายช่วง window ของการสืบค้นข้อมูลแล้วก็ตาม ส่วนหนึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการย่อยได้ของ gp116 เกิดอย่างจำกัด อันเนื่องมาจากการมีขนาดโมเลกุลที่ค่อนข้างใหญ่ จนอาจมีการม้วนพับที่ก่อให้เกิดรูปแบบที่ยากต่อการเข้าถึงของเอนไซม์โปรตีนเอส แม้เป็นไปได้ว่าโครงสร้างโมเลกุลอาจเสียสภาพไปแล้วก็ตามจากขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE การตรึงโปรตีนด้วย fixative solution ซึ่งมีทั้งกรดฟอสฟอริกและเมทานอล การย้อมด้วย colloidal Coomassie Blue G-250 การกำจัดสีย้อมด้วย acetonitrile ในขั้นการเตรียมชิ้นเจลสำหรับการทำ *in gel* digestion แต่ก็ยังเป็นไปได้ว่าสารเคมีเหล่านี้เองเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดลักษณะโครงสร้างที่ทำให้เอนไซม์โปรตีเอสเข้าถึงตำแหน่งของการย่อยไม่ได้

ตารางที่ 5 Calculated m/z และเปปไทด์จาก gp116 ที่ย่อยด้วย Trypsin/Chymotrypsin (C-terminal to K/R/F/Y/W, not before P) แสดงเฉพาะสายที่มีกรดอะมิโน Cysteine

No.	$[M+H]^+$	position	Peptide sequence
1	4990.09	51-99	SEHVQTLCPQTCNTSSPTTT SSATQSLPSSTPSSDADNPC VAQDDAGCY
2	2956.3	691-718	NGPYSLGVPDVSCEIHDETL TCGTNSTF
3	1630.79	727-741	IPYDGPHSVTCINSK
4	1579.68	22-35	EAGQPTEPPDCIHW
5	1565.77	174-188	LHGDSVPVTCPSTPR
6	1311.61	156-167	INNITSVPGCMY
7	1282.67	570-581	AQTRPGVCPTPR
8	1110.55	346-356	TPSVVVCGTTF
9	942.308	43-50	CNSTNCDW
10	902.32	675-683	DSACDSAAY
11	862.315	219-225	THSDNCW
12	767.343	851-857	MCGLDTK
13	697.261	36-42	AANGDCF
14	674.329	721-726	SICSHK
15	599.249	456-460	ISNCY
16	583.254	586-590	QGLCY
17	530.214	313-316	HDCR
18	512.181	492-495	CNEF
19	509.239	846-850	TTGCK
20	307.143	651-653	CGK
21	250.122	217-218	CK

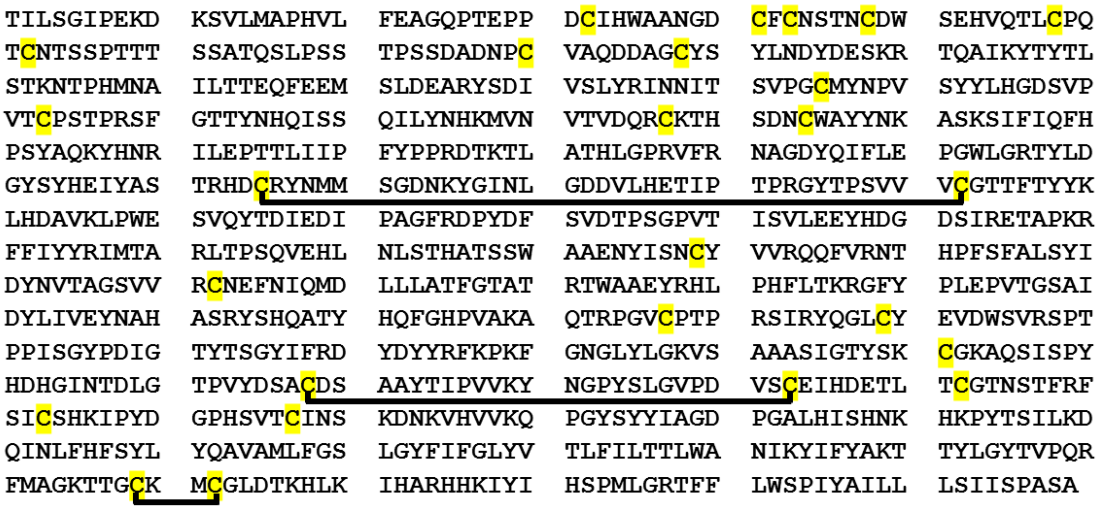
ปัจจัยร่วมส่วนหนึ่งที่อาจเกิดขึ้นได้ คือ ความสามารถในการสกัดชิ้นเปปไทด์ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยอาจทำได้ไม่สมบูรณ์อาจมีเปปไทด์ชิ้นใหญ่ยากต่อการสกัดออกมาจากเนื้อเจล อย่างไรก็ตามในทุกครั้งของการย่อย หลังจากบ่มย่อยไปแล้วเป็นเวลาประมาณ 4-6 ชั่วโมง ผู้วิจัยได้ใช้วิธีการบดชิ้นเจลจลละเอียดด้วยแท่งบด ซึ่งน่าจะเป็นตัวช่วยให้เอนไซม์มีโอกาสสัมผัสพบกับโปรตีนได้มากขึ้น และสามารถสกัดเก็บตัวอย่างจากการย่อยได้สมบูรณ์มากขึ้น อีกประการสำคัญที่อาจเป็นไปได้ คือ ในโมเลกุลของ gp116 อาจมีการก่อพันธะไดซัลไฟด์บางตำแหน่งในลักษณะต่อกันยาว เกิดเป็นชิ้นเปปไทด์หลายๆ ชิ้น ต่อเชื่อมกันเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่เกินกว่าช่วงการวิเคราะห์ที่กำหนดเป็นพารามิเตอร์ของ mass spectrometer และมีความซับซ้อนจนเกินความสามารถในการคำนวณโดยโปรแกรมที่ใช้วิเคราะห์ ทำให้วิเคราะห์การก่อพันธะได้ไม่หมดทุกตำแหน่ง ซึ่งอาจจะต้องใช้วิธีการอื่นๆ มาช่วยในการวิเคราะห์ เช่น การเพิ่มชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย เป็นต้น เพื่อตรวจสอบซ้ำอีกครั้ง

อย่างไรก็ตามไม่จำเป็นเสมอไปที่ cysteine ทุกตำแหน่งในสายโซ่โมเลกุลโปรตีนจะสามารถก่อพันธะไดซัลไฟด์ได้ทั้งหมด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะที่ cysteine สองตำแหน่งถูกดึงให้มาอยู่ใกล้กันมากน้อยแค่ไหน มุมของการม้วนพับของสายโซ่หลักอาจไม่อำนวยให้ sidechain ของ cysteine มาอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับการเกิดพันธะไดซัลไฟล์ระหว่างกันได้ การมีพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลจำนวนมากนั้นทำให้โครงสร้างโมเลกุลโปรตีมีความเสถียร แต่การมีมากเกินไปอาจเป็นการขัดขวางความยืดหยุ่นของโมเลกุลเพื่อการทำหน้าที่เฉพาะอย่างได้

ผลการวิเคราะห์พันธะไดซัลไฟด์ของ gp116 ที่ได้นี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับประกอบการอธิบายการจัดเรียงโมเลกุลโปรตีน gp116 และ gp64 ที่เปลือกหุ้มอนุภาคของ YHV ได้ในอนาคต อีกทั้งอาจใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการออกแบบอุปกรณ์นำส่งระดับนาโนแบบแท่งที่มีโครงสร้างคล้ายอนุภาคไวรัสก่อโรคหัวเหลืองได้

ตารางที่ 6 การก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลโปรตีน gp116

No.	Bonding	Missed cleavage	เอนไซม์	$[m/z]^{x+}$	Search Tool
1	**Cys315-Cys352**				
	$HDC_{315}R$ - $GYTPSVVVC_{352}GTTFTYYK$	0	Trypsin	$[2412.236]^{+}$	MS-Bridge PeptideMap
2	**Cys589-Cys561**				
	$C_{589}YEVDW$ - $C_{651}GK$	1	Tryp/Chymo	$[558.76]^{2+}$	massMatrix,
	$C_{589}YEVDWSVR$ - $C_{651}GK$	2	Try/Chymo	$[731.07]^{2+}$	massMatrix
3	**Cys849-Cys852**				
	$TTGC_{849}KMC_{852}GLDTK$	1	Trypsin	$[419.18]^{3+}$, $[628.27]^{2+}$, $[636.27oxiM]^{2+}$, $[424.52oxiM]^{3+}$	MassMatrix, MasCot
	$FMAGKTTGC_{849}K$ – $MC_{852}GLDTK$	1	Trypsin	$[1838.96oxiM]^{+}$	PeptideMap, MassBridge
	$TTGC_{849}KMC_{852}GLDTK$	3	Tryp/Chymo	$[628.27]^{2+}$, $[419.18]^{3+}$, $[636.27oxiM]^{2+}$, $[424.51oxiM]^{3+}$	MassMatrix, MasCot



รูปที่ 8 แผนผังการก่อพันธะไดซัลไฟล์ในโมเลกุลโปรตีน gp116 ของเชื้อไวรัสก่อโรคหัวเหลือง

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. สามารถทำบริสุทธิ์ไวรัสก่อโรคหัวเหลืองได้อย่างง่ายโดยใช้เพียงการปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะที่ความเร็วรอบ 18,626-20,800 x g โดยไม่ต้องอาศัยการเครื่องมือราคาแพงอย่าง ultracentrifuge และไม่จำเป็นต้องใช้ Urograffin® gradient

2. การวิเคราะห์บนแผ่นเจล SDS-PAGE แสดงให้เห็นว่า ทั้ง gp116 ของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองมีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุล และสังเกตไม่พบการก่อพันธะไดซัลไฟล์ระหว่างโมเลกุลหรือกับโมเลกุลโปรตีนอื่น

3. การวิเคราะห์การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโปรตีนโครงสร้าง gp116 ของไวรัสก่อโรคหัวเหลืองโดยการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE และย่อยโปรตีนโดยวิธี *in gel* digestion ด้วยเอนไซม์ trypsin, chymotrypsin และเอนไซม์ผสม trypsin/chymotrypsin และวิเคราะห์ด้วย nanoLC-MS/MS, MALDI-TOF/TOF ร่วมกับการสืบค้นข้อมูลด้วยโปรแกรม Mascot, MS-Bridge, MassMatrix, MS2DB^{++} และ Peptidemap ในการวิจัยนี้ พบการก่อพันธะไดซัลไฟด์จำนวนเพียง 3 พันธะ คือ Cys315-Cys352, Cys589-Cys561 and Cys849-Cys852 ตามลำดับ

4. ยังคงมี Cysteine บางตำแหน่งที่ไม่ปรากฏในการวิเคราะห์นี้ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการก่อพันธะไดซัลไฟด์ที่ทำให้เกิดเป็นสารประกอบขนาดใหญ่ทำให้เกิดความยุ่งยากต่อการวิเคราะห์ซึ่งอาจต้องใช้วิธีการอื่นมาร่วมวิเคราะห์เพื่อให้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

1. Ryser HJ, Levy EM, Mandel R, DiSciullo GJ. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by agents that interfere with thiol-disulfide interchange upon virus-receptor interaction. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(10):4559-63.
2. Wongteerasupaya C, S Sriurairatana S, Vickers JE, Akrajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, et al. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. Diseases of aquatic organisms. 1995;22:45-50.
3. Wongteerasupaya C, Tongchuea W, Boonsaeng V, Panyim S, Tassanakajon A, Withyachumnarnkul B, et al. Detection of yellow-head virus (YHV) of *Penaeus monodon* by RT-PCR amplification. Diseases of aquatic organisms. 1997;31(3):181-6.
4. Sittidilokratna N, Hodgson RA, Cowley JA, Jitrapakdee S, Boonsaeng V, Panyim S, et al. Complete ORF1b-gene sequence indicates yellow head virus is an invertebrate nidovirus. Diseases of aquatic organisms. 2002;50(2):87-93.
5. Walker PJ, Bonami JR, Boonsaeng V. Roniviridae. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, editors. Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. Lodon: Elsevier/Academic Press; 2004. p. 973-7.
6. Jitrapakdee S, Unajak S, Sittidilokratna N, Hodgson RA, Cowley JA, Walker PJ, et al. Identification and analysis of gp116 and gp64 structural glycoproteins of yellow head nidovirus of *Penaeus monodon* shrimp. The Journal of general virology. 2003;84(Pt 4):863-73.
7. Soowannayan C, Flegel TW, Sithigorngul P, Slater J, Hyatt A, Cramerri S, et al. Detection and differentiation of yellow head complex viruses using monoclonal antibodies. Diseases of aquatic organisms. 2003;57(3):193-200.
8. Wang CS, Tang KFJ, Chen SN. Yellow head disease-like infection in the Kuruma shrimp *Penaeus japonicus* cultured in taiwan. Fish Pathol. 1996;31:177-82.
9. Sittidilokratna N, Chotwiwatthanakun C, Wijegoonawardane PK, Unajak S, Boonnad A, Wangnai W, et al. A virulent isolate of yellow head nidovirus contains a deformed envelope glycoprotein gp116. Virology. 2009;384(1):192-200.
10. Gangnonngiw W, Anantasomboon G, Sang-oum W, Sriurairatana S, Sritunyalucksana K, Flegel TW. Non-virulence of a recombinant shrimp nidovirus is associated with its non structural gene sequence and not a large structural gene deletion. Virology. 2009;385(1):161-8.

11. Assavalapsakul W, Tirasophon W, Panyim S. Antiserum to the gp116 glycoprotein of yellow head virus neutralizes infectivity in primary lymphoid organ cells of *Penaeus monodon*. Diseases of aquatic organisms. 2005;63(1):85-8.
12. Tsai CH, Chan CH, Chen BJ, Kao CY, Liu HL, Hsu JP. Bioinformatics approaches for disulfide connectivity prediction. Curr Protein Pept Sci. 2007;8(3):243-60.
13. Itakura M, Iwashina M, Mizuno T, Ito T, Hagiwara H, Hirose S. Mutational analysis of disulfide bridges in the type C atrial natriuretic peptide receptor. The Journal of biological chemistry. 1994;269(11):8314-8.
14. Liebeton K, Zacharias A, Jaeger KE. Disulfide bond in *Pseudomonas aeruginosa* lipase stabilizes the structure but is not required for interaction with its foldase. Journal of bacteriology. 2001;183(2):597-603.
15. Bonander N, Leckner J, Guo H, Karlsson BG, Sjolin L. Crystal structure of the disulfide bond-deficient azurin mutant C3A/C26A: how important is the S-S bond for folding and stability? European journal of biochemistry / FEBS. 2000;267(14):4511-9.
16. Braakman I, Helenius J, Helenius A. Manipulating disulfide bond formation and protein folding in the endoplasmic reticulum. The EMBO journal. 1992;11(5):1717-22.
17. Opstelten DJ, Wallin M, Garoff H. Moloney murine leukemia virus envelope protein subunits, gp70 and Pr15E, form a stable disulfide-linked complex. Journal of virology. 1998;72(8):6537-45.
18. Cuadras MA, Mendez E, Arias CF, Lopez S. A new cysteine in rotavirus VP4 participates in the formation of an alternate disulfide bond. The Journal of general virology. 1998;79 (Pt 11):2673-7.
19. Wallis TP, Huang CY, Nimkar SB, Young PR, Gorman JJ. Determination of the disulfide bond arrangement of dengue virus NS1 protein. The Journal of biological chemistry. 2004;279(20):20729-41.
20. Fenouillet E, Barbouche R, Courageot J, Miquelis R. The catalytic activity of protein disulfide isomerase is involved in human immunodeficiency virus envelope-mediated membrane fusion after CD4 cell binding. The Journal of infectious diseases. 2001;183(5):744-52.
21. Barbouche R, Miquelis R, Jones IM, Fenouillet E. Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion. The Journal of biological chemistry. 2003;278(5):3131-6.
22. Jain S, McGinnes LW, Morrison TG. Thiol/disulfide exchange is required for membrane fusion directed by the Newcastle disease virus fusion protein. Journal of virology. 2007;81(5):2328-39.

23. Norais N, Tang D, Kaur S, Chamberlain SH, Masiarz FR, Burke RL, et al. Disulfide bonds of herpes simplex virus type 2 glycoprotein gB. Journal of virology. 1996;70(11):7379-87.
24. Einer-Jensen K, Krogh TN, Roepstorff P, Lorenzen N. Characterization of intramolecular disulfide bonds and secondary modifications of the glycoprotein from viral hemorrhagic septicemia virus, a fish rhabdovirus. Journal of virology. 1998;72(12):10189-96.
25. Schutte CG, Lemm T, Glombitza GJ, Sandhoff K. Complete localization of disulfide bonds in GM2 activator protein. Protein science : a publication of the Protein Society. 1998;7(4):1039-45.
26. Rasmussen JT, Berglund L, Rasmussen MS, Petersen TE. Assignment of disulfide bridges in bovine CD36. European journal of biochemistry / FEBS. 1998;257(2):488-94.
27. Douliez JP, Pato C, Rabesona H, Molle D, Marion D. Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. European journal of biochemistry / FEBS. 2001;268(5):1400-3.
28. Lopper M, Compton T. Disulfide bond configuration of human cytomegalovirus glycoprotein B. Journal of virology. 2002;76(12):6073-82.
29. Kamikubo Y, Okumura Y, Loskutoff DJ. Identification of the disulfide bonds in the recombinant somatomedin B domain of human vitronectin. The Journal of biological chemistry. 2002;277(30):27109-19.
30. Kamikubo Y, De Guzman R, Kroon G, Curriden S, Neels JG, Churchill MJ, et al. Disulfide bonding arrangements in active forms of the somatomedin B domain of human vitronectin. Biochemistry. 2004;43(21):6519-34.
31. Barrientos LG, Martin AM, Rollin PE, Sanchez A. Disulfide bond assignment of the Ebola virus secreted glycoprotein SGP. Biochemical and biophysical research communications. 2004;323(2):696-702.
32. Bykova NV, Igamberdiev AU, Ens W, Hill RD. Identification of an intermolecular disulfide bond in barley hemoglobin. Biochemical and biophysical research communications. 2006;347(1):301-9.
33. Kalkhof S, Haehn S, Ihling C, Paulsson M, Smyth N, Sinz A. Determination of disulfide bond patterns in laminin beta1 chain N-terminal domains by nano-high-performance liquid chromatography/matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 2008;22(12):1933-40.
34. Banerjee M, Gupta K, Balaram H, Balaram P. Mass spectrometric identification of an intramolecular disulfide bond in thermally inactivated triosephosphate isomerase from a thermophilic organism *Methanocaldococcus jannaschii*. Rapid communications in mass spectrometry : RCM. 2011;25(14):1915-23.

35. Peng G, Sun D, Rajashankar KR, Qian Z, Holmes KV, Li F. Crystal structure of mouse coronavirus receptor-binding domain complexed with its murine receptor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(26):10696-701.
36. Barbieri R, Baroni D, Moran O. Identification of an intra-molecular disulfide bond in the sodium channel beta1-subunit. Biochemical and biophysical research communications. 2012;420(2):364-7.
37. Yang Y, Ren Y, Shi Y. Intermolecular disulfide bond in the dimerization of S-periaxin mediated by Cys88 and Cys139. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2016;48(4):326-33.
38. Bourchookarn A, Havanapan PO, Thongboonkerd V, Krittanai C. Proteomic analysis of altered proteins in lymphoid organ of yellow head virus infected *Penaeus monodon*. Biochim Biophys Acta. 2008;1784(3):504-11.
39. Assavalapsakul W, Smith DR, Panyim S. Propagation of infectious yellow head virus particles prior to cytopathic effect in primary lymphoid cell cultures of *Penaeus monodon*. Diseases of aquatic organisms. 2003;55(3):253-8.
40. Wongteerasupaya C, Sriurairatana S, Vickers JE, Akrajamorn A, Boonsaeng V, Panyim S, et al. Yellow-head virus of *Penaeus monodon* is an RNA virus. Diseases of aquatic organisms. 1995;22:45-50.
41. Gorman JJ, Wallis TP, Pitt JJ. Protein disulfide bond determination by mass spectrometry. Mass spectrometry reviews. 2002;21(3):183-216.
42. Rinner O, Seebacher J, Walzthoeni T, Mueller LN, Beck M, Schmidt A, et al. Identification of cross-linked peptides from large sequence databases. Nat Methods. 2008;5(4):315-8.
43. Xu H, Zhang L, Freitas MA. Identification and characterization of disulfide bonds in proteins and peptides from tandem MS data by use of the MassMatrix MS/MS search engine. Journal of proteome research. 2008;7(1):138-44.
44. Murad W, Singh R. The MS2DB^{++} webserver: disulfide bond determination through evidence combination. IEEE Trans Nanobioscience. 2013;12(4):340-2.